



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 9/10, 15/54, C07K 13/00 C12N 15/82, C12P 21/08 C12N 5/20, A01H 5/00, 5/10 C07K 3/20</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 92/01782 (43) Date de publication internationale: 6 février 1992 (06.02.92)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00593 (22) Date de dépôt international: 18 juillet 1991 (18.07.91) (30) Données relatives à la priorité: 90402084.9 20 juillet 1990 (20.07.90) EP (34) Pays pour lesquels la demande régionale ou internationale a été déposée: AT etc. (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROUSSEL-UCLAF [FR/FR]; 35, boulevard des Invalides, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VAN ASSCHE, Charles [FR/FR]; La Tartane - Allée des Pins, 84, boulevard du Redon, F-13009 Marseille (FR). LANDO, Danielle [FR/FR]; 17-19, rue de la Plaine, F-75020 Paris (FR). BRUNEAU, Jean-Michel [FR/FR]; 47, avenue Parmentier, F-75011 Paris (FR). VOELKER, Toni, Alois [DE/US]; 1206 Covell Place, Davis, CA 95616 (US). GERVAIS, Monica [FR/FR]; 87, rue des Claies, F-95320 Saint-Leu-la-Forêt (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: TONNELIER, Marie-José; Roussel-Uclaf, 111, route de Noisy, B.P. 9, F-93230 Romainville (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), BR, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</p>
<p>(54) Title: SUCROSE PHOSPHATE SYNTHETASE (SPS), A PREPARATION METHOD AND cDNA THEREFOR, AND USE OF THE cDNA FOR MODIFYING SPS EXPRESSION IN PLANT CELLS</p>		
<p>(54) Titre: SUCROSE PHOSPHATE SYNTHETASE (SPS), SON PROCÉDE DE PREPARATION, SON ADN COMPLEMENTAIRE ET L'UTILISATION DE L'ADN COMPLEMENTAIRE POUR MODIFIER L'EXPRESSION DE LA SPS DANS LES CELLULES VEGETALES</p>		
<p>(57) Abstract SPS 90 kd PEPTIDES</p>		
<p>Proteins having sucrose phosphate-synthetase (SPS) activity and comprising in particular at least one peptide whose amino acid sequence is as follows: ThvTrpIleLys, TyrValValGluLeuAlaArg, SerMetProProIleTrpAlaGluValMetArg, LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMetHisIleSerHisArg, TrpSerHisAspGlyAlaArg; a method for preparing them; cell lines obtained thereby; monoclonal antibodies specific for said proteins; said proteins' cDNA; the use of said cDNA for modifying the expression and control of said proteins in plants; expression vectors containing said cDNA; and plants and seeds obtained by means of said expression vectors, are described.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>L'invention a pour objet les protéines ayant l'activité de la saccharose phosphate synthétase (SPS), comportant notamment au moins un peptide dont la séquence en acides aminés est la suivante: ThvTrpIleLys, TyrValValGluLeuAlaArg, SerMetProProIleTrpAlaGluValMetArg, LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMetHisIleSerHisArg, TrpSerHisAspGlyAlaArg, leur procédé de préparation, les lignées cellulaires obtenues par ce procédé, les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre ces protéines, l'ADN complémentaire de ces protéines, l'utilisation de cet ADN complémentaire pour modifier l'expression et la régulation de ces protéines dans les plantes, les vecteurs d'expression renfermant cet ADN complémentaire ainsi que les plantes et semences obtenues au moyen de ces vecteurs.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mal
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brazil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse			SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	KR	République de Corée	SU*	Union soviétique
CM	Cameroun	LI	Liechtenstein	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LK	Sri Lanka	TG	Togo
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MC	Monaco		

* On ignore encore pour quels Etats de l'ancienne Union soviétique une désignation de l'Union soviétique déploie ses effets.

Sucrose phosphate synthétase (SPS), son procédé de préparation, son ADN complémentaire et l'utilisation de l'ADN complémentaire pour modifier l'expression de la SPS dans les cellules végétales.

5 La présente invention concerne la saccharose phosphate synthétase (SPS), son procédé de préparation, son ADN complémentaire et l'utilisation de ce dernier pour modifier le taux d'expression de SPS dans des cellules végétales.

La présente invention a pour objet les protéines ayant
10 l'activité de la saccharose phosphate synthétase (SPS).

Par cellule végétale, on entend toute cellule de plantes pouvant former des tissus indifférenciés comme des cals ou des tissus différenciés comme des embryons, certaines parties de plantes, des plantes entières ou encore des semences.

15 Par plante, on entend notamment les plantes produisant des graines, par exemple les graminées comme les céréales à paille telles que le blé, l'orge, le maïs ou l'avoine, les légumineuses comme le soja, les plantes oléagineuses comme le tournesol, les plantes à tubercules comme les pommes de terre,
20 les plantes à racines comme la betterave ou les fruits comme la tomate.

L'invention a plus particulièrement pour objet la saccharose phosphate synthétase et notamment la saccharose phosphate synthétase de plantes.

25 Par plantes on entend par exemple les graminées comme par exemple le blé, l'orge, le maïs, la canne à sucre, les légumes comme la tomate et le soja, les fruits, comme les pommes et les bananes.

La saccharose phosphate synthétase est une enzyme clé
30 dans les mécanismes de régulation du saccharose, mais également dans les mécanismes de la régulation du partage du carbone entre l'amidon et le saccharose dans la photosynthèse (voir à ce sujet l'article de Jack PREISS dans TIBS janvier 1984, pages 24 et suivantes, ou encore l'article de Mark STITT
35 et Coll. dans Biochemistry of Plants vol. 10, 1987 pages 327 et suivantes).

La SPS semble spécifique de l'espèce concernée ; Joan L-Walker et Steven C. Huber qui ont purifié et réalisé une

caractérisation préliminaire de la saccharose phosphate d'épinard indiquent clairement que les anticorps obtenus reconnaissent exclusivement la SPS d'épinard (cf PLANT PHYSIOL (1989) 89, 518-524).

- 5 L'invention a plus précisément pour objet la SPS de maïs.
La SPS de maïs pouvant exister sous une forme pure ou pratiquement pure.

L'invention a plus précisément pour objet les protéines définies précédemment de poids moléculaire de l'ordre de 110 à 10 130 kD se présentant sous forme de monomère, dimère ou tétramère et leurs dérivés ayant au moins un peptide dont la séquence en acides aminés est la suivante :

ThrTrpIleLys

TyrValValGluLeuAlaArg

- 15 SerMetProProIleTrpAlaGluValMetArg

LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMetHisIleSerHisArg

TrpSerHisAspGlyAlaArg

L'invention a notamment pour objet les protéines définies précédemment ayant la séquence en acides aminés décrite à la 20 figure 7.

L'invention a également pour objet les dérivés des protéines définies précédemment modifiés par les techniques du génie génétique et présentant l'activité de la SPS.

- L'invention a également pour objet un procédé de préparation 25 tition caractérisé en ce que :

- a) on fait un extrait à partir de parties des plantes conservées à basse température par broyage, centrifugation et filtration,
- b) on enrichit en protéine SPS l'extrait obtenu par précipitation dans un solvant approprié, centrifugation et solubilisation du précipité obtenu dans une solution tampon,
- 30 c) on purifie la protéine active ainsi obtenue par chromatographie et si désiré,
- d) on prépare des hybridomes et des anticorps monoclonaux à partir d'une solution antigénique obtenue à partir d'une des 35 préparations obtenues aux paragraphes a), b), et c) ci-dessus,
- e) crible les hybridomes et sélectionne le ou les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la SPS,

f) purifie la SPS obtenue au moyen des anticorps ainsi préparés.

L'invention a plus précisément pour objet un procédé caractérisé en ce que :

- 5 a) on fait un extrait à partir de parties de plantes de maïs conservées à basse température par broyage, centrifugation et filtration,
- b) on enrichit en protéines l'extrait obtenu par précipitation dans le polyéthylèneglycol, centrifugation et solubilisation
- 10 du précipité obtenu dans une solution tampon,
- c) on purifie la protéine SPS ainsi obtenu par chromatographie d'échange d'anions basse pression, puis par chromatographie sur héparine Sépharose, puis par chromatographie d'échange d'anions haute pression,
- 15 d) on purifie les fractions actives par passage sur 2 colonnes de chromatographie haute pression, et, si désiré,
- e) on prépare des hybridomes et des anticorps monoclonaux à partir d'une solution antigénique obtenue à partir d'une préparation a), b), c),
- 20 f) crible les hybridomes et sélectionne les anticorps dirigés spécifiquement contre la SPS,
- g) purifie la SPS obtenue précédemment au moyen des anticorps ainsi préparés.

Dans un mode de réalisation préféré :

- 25 - le maïs utilisé est un maïs de souche PIONEER 3184,
- les parties de plantes de maïs utilisées sont des feuilles conservées à basse température par exemple entre -50°C et -90°C,
- la purification dans le polyéthylèneglycol (PEG) se fait en
- 30 deux temps :
 - . une première précipitation où la concentration finale en PEG est voisine de 6 %,
 - . une deuxième précipitation où la concentration finale en PEG est voisine de 12 %.
- 35 - les différentes chromatographies sont réalisées comme suit :
 - 1ère chromatographie : DEAE Sépharose,
 - 2ème chromatographie : héparine Sépharose : on peut noter que la préparation ainsi obtenue peut être conservée

- plusieurs jours sans perte majeure d'activité,
3ème chromatographie CLHP : chromatographie Mono Q,
4ème chromatographie CLHP : hydroxylapatite,
5ème chromatographie CLHP : DEAE.
- 5 - au cours de ces différentes étapes de purification et des suivantes, la mesure de l'activité SPS est effectuée de préférence à l'aide de deux méthodes différentes :
- a) une méthode basée sur un test colorimétrique ou test au résorcinol,
- 10 b) une méthode basée sur le dosage de l'un des produits formés au cours des réactions de transformation mettant en jeu la SPS. Ces deux méthodes sont détaillées dans la partie expérimentale exposée ci-après.
- les souris sont immunisées avec plusieurs injections de
- 15 préparation enzymatique purifiée.
- On peut utiliser différentes espèces de souris, par exemple des souris BALB/C.
- L'antigène est utilisé dans l'adjuvant complet de Freund puis dans l'adjuvant incomplet de Freund.
- 20 On effectue sur les souris plusieurs injections de l'antigène : on a obtenu de bons résultats avec trois injections des fractions mono Q suivies de trois injections des fractions finales (aux jours 0, 14, 27, 60, 90 et 105 par exemple).
- 25 Les premières injections ont lieu par voie sous cutanée, par exemple dans les coussinets des pattes, la dernière injection est effectuée par voie intra-veineuse dans la queue par exemple.
- la préparation des suspensions cellulaires de rate ainsi
- 30 immunisées est traitée de façon clonique.
- Les étapes de fusion avec des cellules de myélome, de conservation des hybridomes, de clonage et de production des anticorps sont réalisées selon les méthodes connues.
- Pour détecter les hybridomes sécrétant les anticorps
- 35 dirigés contre l'antigène, on utilise deux méthodes pour sélectionner les anticorps de détection des hybridomes sécrétant dirigés contre l'antigène d'immunisation :
- une méthode de détection des anticorps inhibiteurs de

- l'activité SPS,
- une méthode de l'activité des anticorps dirigés contre
l'activité SPS.

Ces méthodes sont de préférence celles décrites dans la
5 partie expérimentale.

L'invention a également pour objet les lignées cellulaires d'hybridomes obtenues et notamment les lignées cellulaires hybridomes suivantes :

- SPA 2-2-3 : I-971
10 SPA 2-2-22 : I-970
SPA 2-2-25 : I-972
SPB 3-2-19 : I-973
SPB 5-2-10 : I-974
SPB 5-4-2 : I-975
15 SPB 13-1-7 : I-976
SPB 13-2-2 : I-977

qui ont été déposées le 11 juin 1990 auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM-Institut Pasteur) sous les numéros mentionnés.

- 20 L'invention a également pour objet les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la SPS.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de protéines caractérisé en ce que l'on fait passer une
25 chromatographie renfermant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les dites protéines et obtient ainsi les protéines recherchées.

- L'invention a également pour objet les séquences d'ADN codant pour les protéines définies précédemment et notamment
30 la SPS de maïs, dont la séquence apparaît figure 7.

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour l'enzyme saccharose Phosphate Synthétase (SPS) a été préparé comme suit :

- 1 - Séquençage des fragments peptidiques de SPS purifiée.

- 35 Les préparations purifiées de SPS de maïs obtenues précédemment donnent, lors de la séparation sur gel d'acrylamide, une bande minoritaire à 120 kd (correspondant à la séquence protéique totale) et deux bandes majoritaires de 90 et 30 kd.

Ces deux polypeptides sont séparés par électrophorèse puis électroélués. Une digestion tryptique suivie du séquençage des fragments obtenus a permis de déterminer la séquence en acides aminés de 5 peptides (fig. 3). La connaissance de la séquence en acides aminés de ces peptides permet de déterminer la séquence nucléotidique correspondante.

2 - Isolement de l'ARN de feuilles de maïs.

L'ARN total est isolé selon la méthode de TURPEN et GRIFFITH (1986, Biotechniques vol 4 pp 11-15).

10 L'ARN polyA+ est préparé par passage sur colonne d'oligodT cellulose selon les techniques connues.

3 - Construction d'une banque d'ADNc.

La synthèse de l'ADNc est réalisée en utilisant le kit de synthèse "PROMEGA"®. La transcriptase inverse de MMLV est utilisée à la place de la transcriptase inverse AMV. La taille des ADNc obtenus est comprise entre 500 paires de bases et plusieurs milliers de paires de bases. Des adaptateurs EcoRI sont ajoutés aux extrémités de l'ADNc avant clonage dans un vecteur d'expression lambda gt11. La banque d'ADNc contient 20 environ $1,5 \cdot 10^6$ transformants.

4 - Utilisation de la PCR pour la synthèse d'une sonde nucléotidique spécifique de la SPS.

Les oligonucléotides dérivés des séquences des peptides B11 (provenant de la 30 kd) et 4 K (provenant de la 90 kd) décrits dans la fig. 3 sont utilisés comme amorce dans des réactions de type PCR. L'hypothèse de départ est que les polypeptides de 30 et 90 kd sont les produits de dégradation de la protéine SPS de 120 kd. De ce fait les peptides issus des fragments SPS 30 et SPS 90 doivent provenir de la traduction du même ARN messager. Dans cette hypothèse l'utilisation d'un couple d'oligonucléotides correspondant aux séquences des peptides dans une réaction de type PCR doit aboutir à la synthèse d'un fragment d'ADN de taille déterminée si ces oligonucléotides sont complémentaires d'une même séquence 35 d'ADN. Ne connaissant pas la position respective de ces peptides dans la protéine SPS, les différents cas de figure sont expérimentés. Seul le couple d'oligonucléotides CD3 (fig. 4) donne un fragment d'ADN de taille déterminée (1200 paires de

bases).

5 - Tri de la banque d'ADNc :

250 000 transformants lambda gtl1 ont été triés en utilisant le fragment d'ADN de 1200 paires bases obtenu par réaction PCR (décrite précédemment). 16 clones positifs ont été obtenus. La taille des insertions varie de 0,3 kb à 2,8 kb. La séquence obtenue n'est pas complète coté R'. Un deuxième tri de la banque à l'aide d'un fragment d'ADN de 400 pb correspondant à la partie 5' du clone SPS3 permet d'obtenir un clone 10 (SPS 61) allant plus loin dans la partie 5' (fig. 6) sans pour autant avoir l'extrémité 5'.

6 - Réalisation et tri d'une deuxième banque d'ADNc permettant de cloner la partie 5' de l'ADNc codant pour la SPS.

Un oligonucléotide complémentaire de la séquence 5' du 15 clone SPS61 est utilisé comme amorce pour la synthèse de l'ADNc. Après synthèse du deuxième brin, l'ADNc a été cloné dans le phage lambda. La banque contient environ 1 million de clones. Les clones SPS 90 et SPS 77 ont été obtenus lors du tri de cette banque avec SPS 61 (fig. 6). La séquence de ces 20 clones a permis de déterminer la région de recouvrement avec le clone SPS 61. Le clone SPS 90 permet d'atteindre la partie 5' de la SPS.

La vérification de l'ordonnancement des différentes séquences (fig. 6) permettant d'obtenir la séquence complète 25 de l'ADNc a pu être faite en utilisant la technique de PCR. Les amorces utilisées appartiennent aux clones SPS 3 et SPS 90. L'obtention d'un fragment de 750 paires de bases de la taille exacte prédite par la séquence complète permet d'affirmer que les clones SPS 3 et SPS 90 dérivent du même ARN mes- 30 sager.

7 - Assemblage de l'ADNc complet.

L'invention a également pour objet l'ADN génomique / comprenant la partie codant pour les protéines définies précédemment et les séquences nécessaires à l'expression et la 35 régulation de cette protéine dans les plantes.

L'invention a également pour objet un procédé pour modifier le taux d'expression de la SPS dans une plante, caractérisé en ce que l'on transforme les cellules de la dite plante

au moyen d'un vecteur d'expression renfermant l'ADNc défini précédemment.

L'invention a aussi pour objet un vecteur permettant l'expression de la protéine SPS sous le contrôle d'un promoteur capable de diriger l'expression et de préférence la surexpression de la dite SPS dans une cellule de plante et d'une région 3' comportant les signaux de régulation de transcription pour l'expression du gène codant pour la SPS.

L'invention a en outre pour objet les plantes obtenues par la mise en oeuvre de ce procédé.

L'invention a également pour objet les semences obtenues.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

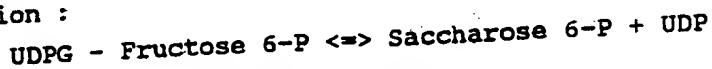
15 1 - PURIFICATION DE LA SACCHAROSE PHOSPHATE DE MAÏS

1.1 - Méthode de dosage de l'activité enzymatique (SPS)

Le suivi de l'activité SPS au cours de la purification est effectué de 2 façons :

a) soit au moyen d'un test colorimétrique (P.S. Kerr et al., Planta, 1987, 170 : 515-519) dit test au résorcinol.

La saccharose Phosphate Synthétase ou UDP glucose - D Fructose - Phosphate Glucosyltransferase catalyse la réaction :



UDPG : Uridine Di-Phospho Glucose

Fructose 6-P ou F6P : Fructose 6-Phosphate

Saccharose 6-P : Saccharose 6-Phosphate

Le saccharose 6-P formé réagit avec le résorcinol pour donner un composé de coloration rouge quantifiable en spectrophotométrie à 520 nm (D.O. 520 nm).

b) soit au moyen d'un système enzymatique couplé (S. Harbron et al., Anal. Biochem. 1980, 107 : 56-59) se composant de la façon suivante :



SPS



5

Nucléoside Diphosphokinase NP_2K 

10

Pyruvate kinase PK



Lactate déshydrogénase LDH

15

On mesure la disparition du NADH à 340 nm et 1 mole de NAD formé ou 1 mole de NADH consommé correspond à 1 mole de saccharose 6 P formé.

20 1.2 - Purification de la SPS (préparation de l'immunogène)

1.2.1 - Extraction

Le matériel de départ pour la purification est constitué de jeunes feuilles de maïs (souche Pioneer 3184) découpées, déveinées, congelées dans l'azote liquide et stockées

25 à -70°C .

250 g de feuilles sont mises en suspension dans 1 l de tampon HEPES 50mM MgCl_2 10mM EDTA 1mM DTT 5mM pH 7,5 (tampon d'extraction) additionné de 11g de Polyvinylpyrrolidone avec barbotage d'azote et refroidissement à 0°C .

30 Les feuilles sont broyées, jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Ce broyat est filtré. Le broyat est alors centrifugé à 14000 g pendant 20 mn à 4°C .

Tout en maintenant un barbotage d'azote, on additionne au surnageant une solution de Poly Ethylène Glycol à 50 %

35 (PEG 8000 "Breox" à 50 % p/v en tampon d'extraction) jusqu'à une concentration finale en PEG de 6 %. Après centrifugation, 20 mn à 14000 g le surnageant est additionné de PEG 50 % jusqu'à concentration finale en PEG de 12 %. Après une nouvelle

centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé par 60 ml de tampon HEPES 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, Ethylène Glycol (EG) 10 %, KCl 0,08 M pH 7,5 (tampon de reprise). Cette solution est clarifiée par centrifugation 10 mn à 40000 g. Le surnageant constitue l'extrait final.

1.2.2 - Chromatographie d'échange d'anion basse pression :
échangeur DEAE sépharose fast-flow

L'extrait final est chromatographié sur une colonne de DEAE Sepharose Fast-Flow équilibrée en tampon de reprise. Après lavage de la colonne avec le même tampon, les protéines adsorbées sur le support sont éluées au moyen d'un gradient linéaire de force ionique croissante entre 0,08 M KCl et 0,35 M KCl dans le tampon HEPES 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, EG 10 % pH 7,5 (tampon A). Le débit appliqué au cours de cette expérience est de 180 ml/h et la chromatographie est effectuée à 4°C.

L'activité SPS est éluée à environ 0,17 M KCl.

1.2.3 - Chromatographie sur Héparine Sépharose

Les fractions contenant l'activité SPS sont rassemblées et diluées au 1/5ème dans le tampon A puis mises en présence de 12 ml d'Héparine Sépharose préalablement équilibré en tampon A. Après 1 h d'incubation avec agitation lente à 4°C, le gel est lavé avec environ 10 volumes de tampon A + 0,05 M KCl puis reconditionné dans une colonne chromatographique.

Les protéines adsorbées sont éluées d'une façon isocratique au moyen d'un tampon CAPS 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, EG 10 %, Tween 80 0,01 %, Heparine 1 mg/ml, Fructose 1 %, KCl 0,25M pH 10 délivré à 60 ml/h. La chromatographie est effectuée à 4°C.

Les fractions contenant l'activité SPS sont rassemblées (fraction héparine) et conservées dans la glace jusqu'à l'étape suivante de purification. L'enzyme à ce stade est stable au moins une semaine.

Les étapes de purifications suivantes sont effectuées à l'aide d'un système de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), et on suit la purification au moyen d'un

détecteur équipé d'un filtre permettant de mesurer l'absorbance dans l'ultra-violet à 280 nm (A280). Les tampons et les fractions récupérées sont maintenus à basse température.

1.2.4 - Chromatographie d'échange d'anion haute performance :

5 Mono Q

La fraction héparine est diluée au 2/3 en tampon Triéthanolamine 20 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, EG 3 %, Tween 80 0,3 % pH 7,5 (tampon A) et chargée sur une colonne FPLC Mono Q HR10/10 préalablement équilibrée avec le même
10 tampon additionné de NaCl (concentration finale 0,18 M). Après retour à 0 de la A280 les protéines adsorbées sur le support chromatographique sont éluées au moyen d'un gradient de sel complexe composé comme suit :

tampon A : cf ci-dessus

15 tampon B : tampon A + NaCl 1 M

	temps (minutes)	% B
	0	18
	0,1	24
20	15	24
	19	26
	23	26
	33	31
	38	31
25	41	100
	43	18

Le débit appliqué sur la colonne est de 180 ml/h.

L'activité SPS est éluée entre 0,26 et 0,31 M NaCl.

Les fractions actives sont rassemblées (fraction Mono Q).

30 1.2.5 - CLHP sur Hydroxyapatite

La fraction Mono Q est chargée sur une colonne CLHP d'hydroxyapatite équilibrée en tampon KH₂PO₄/K₂HPO₄ 20 mM, EG 3 %, Tween 80 0,3 %, DTT 5 mM pH 7,5. Après retour à 0 de la A280 les protéines adsorbées sont éluées au moyen du gradient
35 de phosphate suivant :

tampon A : cf ci-dessus

tampon B : idem tampon A mais 500 mM Phosphate de K

	temps (minutes)	% B.
	0	2
	5	11
	9	13
	14	13
5	29	40
	31	100
	32	100
	35	2

10 Le débit appliqué est 60 ml/h. Il faut noter à ce stade que le phosphate est inhibiteur partiel de l'activité SPS et qu'il est donc difficile de calculer une activité spécifique ainsi qu'un facteur de purification (cf tableau 1).
 15 L'activité SPS est éluée dans ces conditions à environ 60 mM phosphate.

Les fractions actives sont rassemblées et constituent la fraction HAC.

1.2.6 - CLHP sur DEAE 5PW

20 La fraction HAC est chargée sur une colonne CLHP d'échange d'anion de type Di Ethyl Amino Ethyl (DEAE-5PW) préalablement équilibrée en tampon Triéthanolamine 20 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, EG 3 %, DTT 2,5 mM, Bétaine 2 % pH 7,5 (Tampon A) + 0,15 M NaCl.

25 Après retour à 0 de la A₂₈₀ les protéines adsorbées sont éluées au moyen du gradient de NaCl suivant :
 tampon A : cf ci-dessus
 tampon B : idem tampon A avec NaCl 1 M

	temps (minutes)	% B
30	0	15
	0,1	20
	5	20
	22	35
	27	35
35	30	100
	31	15

Le débit utilisé est de 60 ml/h.

L'activité SPS est éluée à environ 0,3M NaCl.

1.2.7 - Obtention de la préparation finale : concentration

La préparation finale est concentrée par chromatographie CLHP sur échangeur Mono Q HR5/5 (5 X 50 mm, Pharmacia) et 5 élution rapide.

La fraction DEAE 5PW (ou la fraction G200) est diluée au 2/3 en tampon A (idem 6) et chargée sur la colonne préalablement équilibrée en tampon A + 0,18 M NaCl. Le gradient suivant est alors appliqué sur la colonne :

10	tampons A & B : idem 6)	
	temps (minutes)	% B
	0	18
	10	40
	12	100
15	13	18

Le débit utilisé est de 60 ml/h.

L'activité SPS est éluée à environ 30 % B (0,3 M NaCl).

La préparation finale est stockée à -20°C jusqu'à 20 utilisation.

Le tableau 1 résume les résultats obtenus aux différentes étapes de purification en terme de quantités de protéines et d'activité SPS.

TABLEAU 1

25	Concentration en protéines (mg/ml)	Volume (ml)	As** (U)	Fp**	R* (%)
	Broyat 1	1000	0,05	0	100
	Extrait final 4 < < 8	60	0,30	6	144
	Frac. DEAE FF 0,4 < < 0,8	70	3	60	168
30	Frac. Héparine 0,2 < < 0,4	25	9	180	90
	Frac. Mono Q (0,02)	30	-	-	-
	Frac. HAC (0,03)	8	-	-	-
	Prep. final 0,05	2	25	500	5

Légende

35 As = Activité enzymatique Spécifique : 1 U correspond à 1 micromole de saccharose formé par minute par mg de protéine à 37°C

Fp = Facteur de purification

R = Rendement

() = valeur approximative

- = non déterminé

Remarques : ** la mesure de la quantité de protéines est effectuée en utilisant la méthode de Bradford. Le Tween interférant énormément dans cette méthode, il n'est pas possible de doser les protéines et donc de calculer une As au niveau des étapes en contenant. De plus le phosphate étant inhibiteur de l'activité SPS, le dosage au cours de l'étape HAC donne un résultat sous-estimé.

* le rendement croissant au cours des premières étapes peut s'expliquer par l'élimination au cours de la purification de certains inhibiteurs de l'activité SPS.

Un profil (SDS-PAGE) illustrant le procédé de purification et la qualité de la préparation finale est donné figure 1. La présence des protéines 120, 95, et 35 Kd (Kilodaltons) est corrélée à l'activité SPS.

Les études de séquence des protéines 35 et 95 Kd faites par la suite, semblent montrer que ces protéines sont vraisemblablement des produits de dégradation de la protéine 120 Kd. De plus les anticorps dirigés contre les protéines 35 et 95 Kd reconnaissent également la protéine 120 Kd en immuno-détection après transfert sur membrane, ce qui démontre une communauté antigénique entre ces trois protéines (voir plus loin). Il faut signaler cependant que l'ajout d'inhibiteurs de protéases dans les tampons durant la purification n'a pas permis d'obtenir une protéine 120 Kd unique.

La saccharose phosphate synthétase semble donc être une protéine di ou tétramérique ayant comme sous-unité de base une protéine de 120 Kd (homo-dimère ou homo-tétramère).

Légende de la figure 1

Profil SDS-PAGE illustrant la purification de la saccharose-phosphate synthétase de maïs : gel d'acrylamide à 8,5 %, conditions réductrices et coloration au nitrate d'argent

35 M : Standard de poids moléculaires β -Galactosidase (116 Kd), Albumine bovine (68 Kd), Ovalbumine (45 Kd), Anhydrase carbonique (29 Kd).

H : Fraction Héparine, 30 microgrammes de protéines par puits

PF : Préparation Finale, 7,5 microgrammes de protéines par puits.

EF : Extrait Final, 7,5 microgrammes de protéines par puits.

D : Fraction DEAE Fast-Flow, 7,5 microgrammes de protéines par 5 puits.

Les bandes de protéines visibles à environ 120 Kd (1), 95 Kd (2) et 35 Kd (3) sont corrélées, au cours des étapes de chromatographie, à la présence d'une activité SPS dans les fractions.

10

2 - PROCEDE DE PREPARATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA SACCHAROSE PHOSPHATE SYNTHETASE

2.1 - Immunisations

15 Les souris BALB/C sont immunisées en injectant par voie sous-cutanée (coussinets et pattes) selon la méthodologie suivante :

Jour 0 Injection d'environ 5 microgrammes de protéines (soit environ 0,3 USPS par souris) : pool Mono Q émulsifié volume à volume avec de l'Adjuvant Complet de Freund (ACF).

20

Jour 14 Injection d'environ 5 microgrammes de protéines (soit environ 0,3 Usps par souris) : pool Mono Q émulsifié volume à volume avec de l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF).

25

Jour 27 Idem J14

Jour 0 + 2 mois Injection d'environ 20 microgrammes de protéines : préparation finale en AIF

Jour 0 + 3 mois Injection d'environ 12 microgrammes de protéines : préparation finale en AIF

30

Jour 0 + 4,5 mois Injection par voie intra-veineuse (IV) dans la queue d'environ 20 microgrammes de protéines : pool final tel que.

La fusion est réalisée 3 jours après l'immunisation IV.

Les sérums sont prélevés à J34, J67, J98 et J159 afin de mesurer la réponse immunitaire (cf screening).

35

2.1.1 - Méthode de screening

La SPS utilisée pour les immunisations n'étant pas parfaitement homogène, il est nécessaire de mettre au point un

test de screening spécifique de cette enzyme. En effet un test de type ELISA révélerait aussi les anticorps dirigés contre les impuretés SPS non-reliées présentes dans les préparations ayant servies aux immunisations.

5 Deux méthodes de détection des anticorps sont utilisées :

- méthode de détection des anticorps inhibiteurs de l'activité SPS
 - méthode de détection des anticorps dirigés contre la SPS
- 10 (inhibiteurs ou non).
- a) Méthode de détection des anticorps inhibiteurs de l'activité SPS

Cette méthode de screening permet de détecter les anticorps se fixant au niveau du site actif de la SPS ou au
15 niveau d'un site proche de celui-ci, et donc empêchant l'accès des substrats. En pratique 70 ul de sérum ou de surnageant de culture d'hybridomes dilué de façon appropriée est mis en présence de 70 ul de préparation de SPS (fraction Héparine). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'activité
20 résiduelle est déterminée à l'aide du dosage enzymatique couplé (Cf I-1). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par comparaison avec la même préparation de SPS traitée de la même façon sans anticorps.

b) Méthode de détection des anticorps dirigés contre la SPS
25 (inhibiteurs ou non)

Cette méthode est basée sur la précipitation du complexe anticorps-SPS à l'aide d'un système entraîneur (Ig anti Ig de souris couplée à des billes de Sépharose : Goat-anti mouse-Sépharose ou GAM Sépharose). En pratique 60 micro-
30 litres de sérum ou de surnageant de culture d'hybridomes dilué de façon appropriée est mis en présence de 60 microlitres de préparation de SPS (fraction Héparine). Après 2 h d'incubation à température ambiante, le mélange est mis en présence de 50 microlitres de GAM-Sépharose à 25 % préalablement lavé 3
35 fois au moyen d'un tampon HEPES 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, EG 10 %, DTT 5 mM pH 7,5. Le mélange est incubé la nuit à 4°C sous agitation vibrante. Après centrifugation 5 minutes à 3000 t/mn l'activité SPS résiduelle dans le surnageant est

déterminée à l'aide du dosage enzymatique couplé (Cf 1.1). Les résultats sont exprimés en pourcentage de précipitation (% préc.) par comparaison avec la même préparation de SPS traitée de la même façon sans anticorps.

5 2.1.2 - Résultats

10 souris ont été immunisées selon le protocole décrit plus haut. Le tableau suivant donne les résultats des dosages de précipitation effectués avec les hétéro-antiséras des 10 souris à J159. Les sérums sont dilués au 1/200.

10 SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% PREC.	45	22	32	64	36	30	22	16	39	37

Des dilutions supplémentaires du sérum de la souris 4 donnent les résultats suivants :

15

	DILUTION	% PRECIPITATION
	1/200	67
	1/400	48
	1/600	29
20	1/1000	20

Les rates des souris 1 et 4 sont utilisées pour la fusion.

2.2 - Fusion cellulaire

25 Les splénocytes des souris sont fusionnées avec des cellules de myélome de souris SP2/0-Ag14 selon un ratio 2/1 en présence de polyéthylène glycol 1500 à 45 %. La sélection des hybridomes est effectuée en ajoutant de l'hypoxanthine et de l'azaserine au milieu de culture 24 et 48 heure après la fusion.

30

Les hybridomes sont clonés et sous-clonés par la méthode de dilution limite.

2.2.1 - Résultats du criblage des hybrides et des clones

35

HYBRIDES

SOURIS 4 (fusion SPA)	SOURIS 1 (fusion SPB)
2 Hybrides positifs sur 45	6 Hybrides positifs sur 52

WO 92/01782

18

SPA2 : 38 % préc.
SPA19 : 7 % préc.

SPB3 : 17 % préc.
SPB5 : 67 % préc.
SPB8 : 53 % préc.
SPB13 : 68 % préc.
SPB25 : 13 % préc.
SPB34 : 17 % préc.

5

CLONES

FUSION SPA

10 2 clones retenus sur 36

SPA2-2 : 85 % préc.
SPA19-7 : 8 % préc.

15

FUSION SPB

7 clones retenus sur 46

SPB3-2 : 19 % préc.
SPB5-1 : 76 % préc.
SPB5-2 : 71 % préc.
SPB5-3 : 45 % préc.
SPB5-4 : 24 % préc.
SPB13-1 : 79 % préc.
SPB13-2 : 53 % préc.

20

SOUS-CLONES

FUSION SPA

3 sous-clones retenus sur 48 5 sous-clones retenus sur 72

SPA2-2-3 : 60 % préc.
25 SPA2-2-22 : 33 % préc.
SPA2-2-25 : 92 % préc.

SPB3-2-19 : 21 % préc.
SPB5-2-10 : 86 % préc.
SPB5-4-2 : 46 % préc.
SPB13-1-7 : 87 % préc.
SPB13-2-2 : 93 % préc.

30 2.2.2 - Production des anticorps monoclonaux anti-SP8

Les hybridomes sont injectés par voie intra-péritonéale à des souris BALB/c femelles préalablement traitées par du pristane. Les anticorps monoclonaux sont partiellement purifiés à partir des liquides d'ascites ainsi
35 produits par précipitation par du sulfate de sodium à 18 %. Les protéines précipitées sont dissoutes puis dialysées contre du PBS (F18).

2.2.3 - Caractérisation des anticorps monoclonaux anti-SP8

a) type.

Le typage est fait à l'aide d'un test ELISA. Des anti-corps de lapin anti-IgG et anti-IgM de souris (ZYMED) sont fixés au fond des puits de plaques 96 puits. Après une nuit à 5 température ambiante les sites non occupés sont saturés avec une solution d'albumine sérique bovine à 3 % dans du PBS. Après une heure d'incubation à 37°C et plusieurs lavages, les différents F18 sont déposées dans les puits. Après incubation et plusieurs lavages, des anti-corps de chèvre ou de lapin, 10 anti-classe et anti-sous classe d'immunoglobulines de souris, couplés à peroxydase, sont ajoutés. Après une heure à 37°C, on révèle les anti-corps à l'aide du système H_2O_2 /ABTS.

Tous les anticorps monoclonaux anti-SPS sont du type Ig G₁.

15 b) Inhibition de l'activité SPS

La détermination de la capacité des anticorps à inhiber l'activité SPS est faite à l'aide de la technique citée plus haut (Cf 2.1.1 a) en utilisant les F18.

	Concentration en anticorps (microgrammes/ml)	% Inhibition
20		
Anticorps		
SPA2-2-3	50	0
SPA2-2-22	50	0
SPA2-2-25	50	0
25 SPB3-2-19	50	0
SPB5-2-10	50	0
SPB5-4-2	50	0
SPB13-1-7	50	50
	25	55
30	5	25
	2,5	10
	1	2,1
SPB13-2-2	50	60,1
	25	59,1
35	5	33,8
	2,5	14,2
	1	8,7

c) Immuno-précipitation de l'activité SPS

La détermination de la capacité des anticorps à immuno-précipiter l'activité SPS est faite à l'aide de la technique citée plus haut (Cf 2.1.1 b) en utilisant les F18.

	Concentration en anticorps (microgrammes/ml)	% Précipitation
5		
Anticorps	50	95
SPA2-2-3	25	92
	5	80
	2,5	40
10	1	20
	50	95,7
SPA2-2-22	25	95
	10	51
	5	48,2
15	2,5	25
	1	10
Anticorps		
SPA2-2-25	50	91,3
	25	95,3
20	5	90,4
	2,5	22,8
	1	12,5
	50	95
SPB3-2-19	25	95
25	5	27,8
	2,5	17,8
	1	9,3
	50	95
SPB5-2-10	25	95
30	5	81,1
	2,5	41,4
	1	22,6
	50	95
SPB5-4-2	25	95
35	5	86,1
	2,5	57,2
	1	26,1

5	SPB13-1-7	50	95
		25	95
		10	65,4
		5	48,1
		2,5	15
10		1	10
	SPB13-2-2	50	95
		25	95
		5	71,8
		2,5	43,5

3 - UTILISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX POUR LA CARACTERISATION ET LA PURIFICATION DE LA SACCHAROSE PHOSPHATE SYNTHETASE

3.1 - Caractérisation de la Saccharose Phosphate Synthétase de

Mais

Cette caractérisation est effectuée à l'aide des anticorps SPB3-2-19 et SPB13-2-2 par la technique d'immuno-détection après transfert des protéines à partir d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE) sur membrane de nitrocellulose.

Après migration en gel d'acrylamide à 12,5 % (Nature 227 (1970) 680-685), les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0,22um (Schleicher et Schuell) au moyen d'une cuve de transfert pendant 30 mn, l'ampérage initial étant de 1 Ampère. Le tampon utilisé est le tampon d'électrophorèse classique (TRIS base 3,03 g/l, Glycine 14,4 g/l, SDS 0,1 % pH 8,3) auquel est ajouté 20 % de méthanol.

Après transfert, la membrane est mise en bain de saturation (Caséine 0,5 % en PBS) afin de saturer les sites non occupés par les protéines provenant du gel. Après 1 h à 37°C sous agitation douce, la membrane est lavée 3 à 4 fois en tampon de lavage (Caséine 0,1 %, Tween 20 0,5 %, en PBS) puis incubées avec une solution à 10 microgrammes/ml de l'anticorps monoclonal à tester. On incube une partie de la membrane en parallèle avec un anticorps non-immun (témoin négatif). Après 1 h d'incubation à température ambiante suivie de 9 à 10 lavages,

la membrane est incubée en présence d'un anticorps anti-anticorps de souris marqué à l'Iode 125 dilué en tampon de lavage (50000 cpm par cm² de membrane). Après 1 h d'incubation à température ambiante suivie de 9 à 10 lavages, la membrane est séchée puis autoradiographiée (film X-OMAT AR KODAK et écran amplificateur Cronex XTRA Life DUPONT).

Une autoradiographie est présentée figure 2. Un fort signal est observé au niveau des bandes protéiques 120 Kd, 95 Kd et 35 Kd ce qui est en corrélation avec les résultats précédents (voir première partie).

Légende de la figure 2

- A : membrane incubée en présence de l'anticorps SPB3-2-19
- 15 B : membrane incubée en présence d'un anticorps non dirigé contre la SPS (anticorps monoclonal anti-néomycine Témoin négatif)
- C : membrane incubée en présence de l'anticorps SPB13-2-2
- M : standards de poids moléculaires radio-marqués par l'I125 (NEX-188 NEN) B-Galactosidase (116 Kd), Albumine bovine (68 Kd), Anhydrase carbonique (29 Kd), Inhibiteur tryptique (20,1 Kd), Alpha-Lactalbumine (14,4 Kd), 150000 cpm par dépôt
- PA : dépôt des protéines obtenues après chromatographie d'immunoaffinité (voir plus loin) avec l'anticorps monoclonal
- 25 SPB13-2-2, environ 40 microgrammes de protéines par dépôt.
- H : dépôt de la fraction Héparine, environ 40 microgrammes de protéines par dépôt.

3.2 - Purification de la Saccharose Phosphate Synthétase par immunoaffinité

30 Une méthodologie de purification de la Saccharose Phosphate Synthétase de maïs sur support d'immunoaffinité a été mise au point afin d'augmenter la quantité de protéine récupérée en réduisant le nombre d'étapes de purification et de permettre ainsi des études de séquençage.

3.2.1 - Préparation de l'immuno-adsorbant

35 La F18 (voir 2.2.2) correspondant à l'anticorps SPB13-1-7 ou à l'anticorps SPB13-2-2 est mis en présence de CH-

Sépharose activé, à raison de 1 mg d'anticorps par ml de gel. Après incubation 2 h à température ambiante, les sites non occupés par les anticorps sont saturés par l'éthanolamine 1 M pH 9. Le support est ensuite lavé alternativement avec les 5 tampons acétate 0,1 M NaCl 0,5 M pH 4 et TRIS 0,1 M NaCl 0,5 M pH 8. Le support d'immunoaffinité ainsi préparé est conservé à 4°C en tampon HEPES 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Azoture de sodium (azide) 0,01 % pH 7,5.

3.2.2 - Chromatographie d'immunoaffinité

10 La fraction Héparine correspondant à la purification de la SPS est additionnée de PEG 50 % (voir 1.2.1) jusqu'à une concentration finale en PEG de 20 %. Après incubation 30 mn à 4°C avec agitation lente, le mélange est centrifugé à 1600 g pendant 30 mn. Le culot protéique est repris dans la moitié du 15 volume de départ de tampon 50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 % éthylène glycol pH 7,5. Cette étape permet d'éliminer le tampon précédant qui est incompatible avec la chromatographie d'immunoaffinité et de concentrer les protéines. Le rendement en activité SPS est de 80 à 90 %.

20 La solution obtenue est appliquée avec un débit de 0,1 ml/mn sur 1 ml de support d'immunoaffinité conditionné dans une colonne et sur lequel a été fixé un anticorps non dirigé contre la SPS (CNBr-Sépharose activé, sur lequel est fixé un anti-corps anti-neomycine). Cette première étape 25 permet d'éliminer certains contaminants se fixant de façon aspécifique sur le support de chromatographie. L'effluent de la colonne non-spécifique est à son tour appliqué sur le support d'immuno-affinité anti-SPS (2 ml dans une colonne de 11 X 20 mm) avec un débit de 0,1 ml/mn. Ces deux étapes sont 30 effectuées à la température du laboratoire. Après lavage de la colonne avec 10 ml de tampon de charge puis avec un tampon de lavage (Tampon de charge additionné de NaCl 0,25 M et Twenn 20 0,3 %) jusqu'à ce que l'absorbance dans l'ultra-violet à 280 nm soit proche du niveau de base, les protéines adsorbées 35 sur le support sont éluées avec une solution de triéthylamine 50 mM pH 11. Cette élution s'effectue à 4°C et la colonne d'immuno-affinité est renversée pour obtenir un rendement optimum. Le profil SDS PAGE de la préparation finale obtenue

correspond à ce qui est obtenu à l'aide du protocole classique (voir 1). Il faut noter que la méthode d'élution des protéines adsorbées sur le support d'immuno-affinité est inhibitrice non-réversible de l'activité SPS mais le rendement de récupération des protéines SPS-religées est optimal par comparaison avec des essais faits en conditions d'élution native. L'éluat de la colonne d'immuno-affinité est dessalé à l'aide de la colonne de G25, contre un tampon 0,14 % Glycérol, 0,07 % B-mercaptoéthanol, 0,04 % SDS, 0,9 mM TRIS pH 6,8 (tampon d'électrophorèse en conditions réductrices dilué 70 fois). Après dessalage, la préparation protéique est concentrée 70 fois à l'aide d'un concentrateur sous vide et les protéines SPS sont purifiées par SDS-PAGE (voir plus loin).

15 **EXEMPLE 1 : Construction d'un ADNC complet codant pour la SPS**

A) Séquence des polypeptides SPS

Des échantillons d'une préparation de protéine purifiée obtenue comme il est décrit précédemment sont soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide SDS.

20 Après électrophorèse, les bandes de protéines sont détectées par traitement au chlorure de potassium comme l'ont décrit Bergman et Joernvall (Eur. Jour. Biochem. (1978) 169, 9-12) et les bandes observées correspondant à des poids moléculaires de 90 kD et 30 kD sont excisées. Les protéines sont électro-élues de ces fragments de gel à l'aide d'un Concentrateur Electrophorétique selon les recommandations du fabricant (ISCO ; Lincoln, Nebraska) dans 4 mM d'acétate de sodium, pH 8. Après électro-élution, les quantités de protéines récupérées sont déterminées par comparaison avec une solution de concentration connue d'albumine bovine sérique (BSA) par coloration au Bleu Coomassie. On obtient approximativement 30 microgrammes de protéines 30 kD et 75 microgrammes de protéines 90 kD.

Les protéines sont concentrées par précipitation acétonique et remises en suspension dans un tampon de 50 mM de carbonate d'ammonium, pH 8. Digestion tryptique et purification HPLC sont effectuées comme le décrivent Sturm et Chrispeels (Jour. Biol. Chem. (1987) 262, 13392-13403). Rapidement, la

digestion est effectuée par l'addition de trypsine, et une incubation de deux heures à 37°C. La digestion est ensuite répétée. Les protéines sont concentrées par lyophilisation et remises en suspension dans un tampon de 50 mM de phosphate de sodium, pH 2,2. Ce mélange est soumis à une chromatographie phase inverse HPLC par application sur une colonne C18. L'élution est effectuée en utilisant un gradient croissant d'acétonitrile. L'élution réalisée par le mélange tampon de phosphate/gradient acétonitrile est suivie spectrophotométriquement à 214 nm. Les fractions correspondant aux pics d'absorption à 214 nm sont recueillies, lyophilisées, remises en suspension dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1 %, appliquées à nouveau à la colonne C18, et éluées en utilisant un gradient d'acétonitrile. L'élution réalisée par le mélange acide trifluoroacétique/gradient acétonitrile est suivie spectrophotométriquement à 214 nm. Les fractions correspondant aux pics d'absorption à 214 nm sont recueillies, lyophilisées, et soumises à une dégradation de protéines de type Edman au moyen d'un séquenceur automatique de protéines (Applied Biosystems ; Foster City, California). Des séquences de 5 peptides sont obtenues. (Voir figure 3).

B) Isolation d'ARN de feuilles de maïs

Des feuilles entières et complètement développées sont cueillies sur des plants végétatifs d'hybride 3184 de maïs Pioneer de deux pieds de haut (60,96 cm). Les feuilles sont cueillies tard dans la matinée, congelées dans un bain d'azote liquide, et gardées à -70°C. L'ARN total est isolé selon la méthode de Turpen et Griffith (Biotechniques (1986) 4, 11-15). Brièvement, 250 g de matériel sont homogénéisés dans 4 M de thiocyanate de guanidine et 2 % de sarcosyl. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant appelé Lysat clair est déposé sur un coussin de 5,7 M CsCl et centrifugé pendant 5,5 heures à 50.000 tr/min. Le culot d'ARN est dissous dans l'eau, extrait avec du phénol et du chloroforme, et précipité avec de l'éthanol. Le culot résultant est remis en suspension dans l'eau. Le rendement final de l'isolation d'ARN est quantifié par spectrophotométrie UV. Une suspension saturée de

poudre de cellulose/eau est ajoutée au mélange ARN/eau, à 10 % du volume total, pour enlever les polysaccharides résiduels. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ARN est appliqué à une colonne d'oligo (dT)-cellulose comme décrit dans Maniatis et al. (Molecular Cloning, A. Laboratory Manual, (1982) Cold Spring Harbor, New-York). La fraction contenant l'ARN poly(A) est ensuite appliquée à nouveau à la colonne. La fraction éluée contenant l'ARN poly(A) est extraite avec du phénol et l'ARN est précipité avec de l'éthanol.

10 C) Construction et tri d'une banque d'ADNc

La synthèse de l'ADNc est effectuée selon les recommandations du fabricant (Système de Synthèse RiboClone™ cDNA par Promega, Madison, Wisconsin), utilisant cinq microgrammes d'ARN poly(A) comme matrice la transcriptase inverse M-MLV (BRL ; Bethesda, Maryland) est substituée à la transcriptase inverse AMV. Des oligonucléotides adaptateurs EcoRI sont ajoutés à l'ADNc à bouts francs et les fragments résultants sont clonés dans un vecteur d'expression (LambdaZAP, Stratagene ; La Jolla, California) selon les recommandations du fabricant. La banque obtenue contient approximativement $1,5 \times 10^6$ transformants.

En utilisant l'information donnée par la séquence des peptides du stade A et la réaction en chaîne de polymérase (PCR), un fragment de 1200 pb correspondant à l'ADNc de la SPS est généré. L'ADNc total obtenu à partir d'ARN de feuille de maïs est utilisé comme matrice et des oligonucléotides dégénérés, synthétisés à partir des données de séquences des peptides des protéines 30 kD et 90 kD, sont utilisés comme amorce. Ces séries d'amorces sont appelées CD3 et CD4. (Fig. 4).

30 L'utilisation de la série correcte d'amorces, qui est CD3, résulte en un fragment créé par réaction PCR. La réaction de PCR utilisant l'autre série d'amorces, CD4, ne résulte pas en la synthèse d'un fragment. Fig. 5. La réaction de PCR est effectuée selon les recommandations du fabricant (GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit and DNA Thermal Cycler of Perkin Elmer Cetus ; Norwalk, Connecticut) excepté la réaction qui est poursuivie pendant 30 cycles, et les étapes de réhybridation qui sont effectuées à 50°C pendant 1 minute. L'analyse

Southern confirme que la bande de PCR n'est pas un artefact, comme démontré sur la figure 5. La sonde 4K5 est utilisée car la séquence correspondant à cette sonde est supposée être dans le fragment de 1200 pb si ce fragment correspond à la séquence 5 SPS. La sonde hybride à la bande 1200 pb générée par PCR en utilisant la série d'amorces DC3 mais non aux produits PCR générés en utilisant la série d'amorces CD4. (Fig. 5).

Le fragment 1200 pb généré par PCR est marqué avec ^{32}P [^{32}P =phosphore radioactif] (suivant le Random Primed DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) et utilisé comme sonde pour trier approximativement 250.000 plaques d'une banque d'ADNc. Les insertions de clones positifs sont analysées par analyse de restriction avec EcoRI, et les clones possédant les plus longues insertions SPS#3 et SPS#18, sont choisis pour une analyse plus poussée. (Fig. 6). Un fragment de 400 pb HindIII/EcoRI de la partie terminale 5' du SPS#3 est isolé, puis marqué avec ^{32}P par marquage au hasard (Random Primed DNA Labeling Kit) et utilisé comme sonde pour retrier la banque. Un nouveau clone, appelé SPS#61, qui remonte beaucoup plus loin en amont que le SPS#3, est isolé. (Fig. 6).

Pour isoler les clones d'ADNc qui comprennent davantage de région 5' que le SPS#3 ou le SPS#61, une nouvelle banque d'ADNc est préparée (suivant le RiboCloneTM cDNA Synthesis System by Promega ; Madison, Wisconsin) utilisant la transcriptase inverse M-MLV au lieu de la transcriptase inverse AMV. Cependant, au lieu d'utiliser l'oligo (dT) comme amorce, une amorce synthétique, 23B, synthétisée à partir de la séquence 5' du clone SPS#61, est utilisée. Ceci résulte en l'obtention d'ADNc qui contiennent seulement les régions en amont de la région 5' du SPS#61. La banque est triée en utilisant comme sonde le fragment EcoRI de SPS#61 marquée au ^{32}P , et 16 plaques sont positives en hybridation. Les clones avec les insertions les plus longues, SPS#77 et SPS#90, sont choisis pour une analyse plus poussée. L'étude de la séquence des ADN de SPS#77 et SPS#90 montre que la région de recouvrement (de taille supérieure à 100 pb) avec SPS#61 est identique, et que tous les deux remontent plus haut en amont dans la

région 5'. (Fig. 6).

La PCR effectuée en utilisant un ADNc simple brin (obtenue par réaction de la transcriptase inverse sur l'ARNm en utilisant un oligo (dT) pour réaliser l'amorce bicaténaire 5 nécessaire à la transcriptase inverse) comme matrice et des amorces choisies parmi les séquences de SPS#90 et SPS#3, confirment que SPS#90 et SPS#3 viennent de la transcription du même ARNm. Le fragment résultant de cette réaction PCR est de 750 pb de longueur, compatible avec la taille attendue par 10 l'étude de la séquence du ADN. Ce fragment de 750 pb est sous-cloné dans un vecteur dérivé de Bluescript sous forme d'un fragment SAL I/Hin III. Quatre des sous-clones résultants ont été partiellement séquencés et la séquence obtenue est identique à la séquence du ADN préalablement déterminé.

15

D) Assemblage de la séquence codante de la SPS

Les deux brins de #90, #61, et #3 sont séquencés par la méthode de Sanger et al. (PNAS (1977) 74 : 5463-5467). La phase de lecture de la SPS déterminé par la connaissance des 20 séquences de peptides, montre que les premiers codons méthionine sont placés aux positions 112 pb et 250 pb. Fig. 7. Le codon à 112 pb correspond à une séquence consensus encaryotique de démarrage de traduction (Kozak, Cell (1986) 44 : 283-292) et est placé 54 pb en aval d'un codon d'arrêt TAG (pb 25 58). Un arrêt traductionnel est trouvé dans le clone SPS#3, à pb 1603. Cependant, un autre clone d'ADNc, obtenu lors du tri initial de la banque d'ADNc (voir Exemple 2), appelé SPS#18, ne présente pas un codon d'arrêt à la position 1603. De ce fait la région pb 1603 du SPS#18 est utilisée pour réaliser la 30 construction finale de longueur complète (voir plus bas).

La séquence complète codant pour la SPS peut être préparée en combinant le fragment de 529 pb Bam HI/Hin dIII du SPS#90, le fragment de 705 pb Hin dIII du SPS#61, le fragment de 686 pb Hin dIII du SPS#18, et le fragment de 1476 pb 35 Hin dIII/Eco RI du SPS#3.

Les cinq séquences des peptides dérivés de SPS 30 kD- et SPS 90 kD- (voir Stade A) sont retrouvées dans la séquence de protéine déduite de l'étude de la phase ouverte de lecture d

l'ADNc. (Fig. 7).

EXEMPLE 2 : Détection de Polypeptides SPS par Antisera Spécifiques

Des échantillons de préparations de protéines purifiées
5 obtenus par la méthode décrite précédemment sont soumis à
l'électrophorèse en gel d'acrylamide SDS. Les protéines du gel
d'acrylamides sont fixées et révélées par coloration. Les
bandes correspondant aux polypeptides 90 kD et 30 kD sont
excisées, broyées et injectées dans des lapins. L'analyse
10 Western (comme décrite par Oberfelder, *Focus* (1989) 11 (1) :
1-5) montre que les anticorps isolés à partir du sérum du
lapin injecté avec le peptide SPS 30 reconnaissent les bandes
correspondant aux peptides SPS 30 et SPS 120 sur du gel
d'acrylamide SDS. Les anticorps isolés à partir du sérum du
15 lapin injecté avec le peptide SPS 90 reconnaissent les bandes
correspondant aux polypeptides SPS 90 et SPS 120.
(Fig. 8).

Localisation Immunologique de SPS dans la plante de maïs

Les protéines totales sont extraites de feuilles d'une
20 plante de maïs de 30 jours, cueillies à 11 heures du matin, en
les portant à ébullition dans un tampon SDS. Les extraits de
protéines sont déposés sur des gels d'acrylamide SDS, en deux
répliques. Un gel est coloré au Bleu de Coomassie, alors que
l'autre est soumis à l'analyse Western, en utilisant un
25 mélange d'antisera anti SPS30 et anti SPS90 comme sonde. (Fig.
9). Les bandes les plus intenses apparaissant sur le gel
coloré au Bleu de Coomassie sont identifiées comme étant la
phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase), une enzyme inter-
venant dans la photosynthèse. La tache Western met en évidence
30 la présence de la SPS. Le profil d'apparition des protéines
SPS est très semblable au profil d'apparition des protéines
PEPcase pas présent dans les racines, et pas présent dans la
section de feuille le plus près de la tige, ni dans les
feuilles très jeunes. Ce profil correspond à l'expression de
35 protéines associées à la photosynthèse, et est le diagramme
attendu pour la SPS.

EXEMPLE 3 : Construction de vecteurs d'expression

Construction d'un système de relevé de SPS de longueur complète

Un clone SPS#90 (Fig. 6), est digéré avec HindIII et lié au fragment de 705 pb HindIII du clone SPS#61 pour créer un plasmide contenant la région 5' terminale de la partie codant pour la SPS. Le plasmide résultant est digéré avec BamHI et digéré partiellement avec HindIII, résultant en un fragment de 1340 pb BamHI/HindIII contenant la région 5' terminale de la SPS. La région 3' terminale de la partie codant pour la SPS est obtenue en remplaçant le fragment de 686 pb HindIII (positions 1340-2036) du clone SPS#3 avec le fragment de 646 pb HindIII du SPS#18 (pour enlever le codon d'arrêt). Toute la région 3' terminale est ensuite récupérée par digestion EcoRI et digestion partielle HindIII, résultant en un fragment 1172 pb HindIII/EcoRI. Ce fragment HindIII/EcoRI, portant la région 3' terminale, est lié au fragment BamHI/EcoRI portant la région 5' terminale dans un vecteur dérivé de pUC digéré par BamHI/EcoRI, pour créer un plasmide portant toute la région codant pour la SPS, soit 3406 pb.

20 Construction de la Cassette Promoteur Petite Sous-Unité de la ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase de tabac [*2]

La région codant pour la SPS peut être clonée d'une manière commode sous forme d'un fragment BamHI/EcoRI (pb 106 - pb 3506) dans une cassette promoteur petite sous-unité de 25 tabac (SSU).

Une cassette promoteur SSU, pour l'expression de la SPS, peut être préparée comme suit. La région promoteur SSU est sortie du PCGN627 (décrit plus bas) sous forme d'un fragment Asp718/SalI, et liée dans un plasmide pCGN1431 digéré par 30 Asp718/SalI (décrit plus bas), résultant en une cassette contenant le promoteur SSU et la région 3' tml séparés par un fragment d'ADN portant des sites de restriction.

Après ligation du fragment d'ADN codant pour la SPS dans la cassette promoteur SSU/tml3', la région SSU/SPS/tml3' peut 35 être liée dans un vecteur binaire et intégrée dans un génome de plante par transformation via *Agrobacterium tumefaciens*.

[*3]

PCGN627

Le fragment 3,4 kb EcoRI du TSSU3-8 (O'Neal et al., Nucleic Acids Res (1987) 15 : 9661-8677), contenant la région promoteur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, est cloné dans le site EcoRI du M13mp18
5 (Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 53 : 103-119) pour produire un clone M13 8B. L'ADN simple brin de ce phage M13 8B est utilisé comme matrice pour prolonger l'amorce d'oligonucléotide "Probe 1" dont la structure est définie dans l'article de O'Neal (O'Neal et al., Nucleic Acids Research (1987) 15
10 ; 8661-8677) en utilisant le fragment Klenow de l'ADN polymérase I. Les produits de cette réaction à la polymérase sont traités avec de la nucléase de haricot mung (Mung Bean Nuclease) et ensuite digérés avec HindIII pour produire un
15 fragment 1450 pb contenant la région promoteur SSU. Ce fragment est cloné dans pUC18 digéré par HindIII-SmaI (Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 53 : 103-119) pour produire pCGN625.

pCGN625 est digéré par l'enzyme de restriction HindIII, les régions terminales sont remplies avec le fragment Klenow
20 de l'ADN polymérase I et le plasmide ainsi obtenu est redigéré avec l'enzyme de restriction EcoRI. Le fragment EcoRI/HindIII-rempli contenant la région promoteur SSU est lié par ligation au plasmide pUC18 digéré par SmaI/EcoRI pour produire pCGN627.

25 pCGN1431 contient le promoteur double CAMV 35S et la région tml 3' avec un site de clonage multiple entre eux. Cette cassette promoteur/terminateur est contenue dans un vecteur dérivé de pUC qui contient un gène de résistance au chloramphénicol au lieu du gène de résistance à l'ampicilline.
30 La cassette est bordée de sites multiples de restriction pour être d'utilisation aisée.

A) Construction de pCGN986

pCGN986 contient le promoteur 35S du virus de la mosaïque de choux fleur (CaMV35) et une région tml-3' du T-DNA avec des
35 sites multiples de restriction entre eux. Le plasmide pCGN986 est dérivé d'une autre cassette, pCGN206, contenant le promoteur de CaMV35S et une région 3' différente, la région 3' terminale VI de la région CaMV. Le promoteur de CaMV35S est

cloné sous forme d'un fragment AluI (pb 7144-7734) (Gardner et al., Nucl. Acids Res. (1981) 9 : 2871-2888) dans un site HincII de M13mp7 (Messing et al., Nucl. Acids Res (1981) 9 : 309-321) pour créer C614. La digestion par l'enzyme de restriction EcoRI du C614 produit le fragment EcoRI contenant le promoteur 35S qui est cloné dans un site de restriction de pUC8 (Vieira et Messing, Gene (1982) 19 : 259-268) pour produire pCGN147.

pCGN148a contenant une région promoteur, un marqueur permettant une sélection (Kanamycine avec 2 ATG's), et une région 3', est préparé par digestion du plasmide pCGN528 avec BglII et insertion du fragment promoteur BamHI-BglII du pCGN147. Ce fragment est cloné dans le site BglII du pCGN528 en faisant en sorte que le site BglII soit proche du gène de Kanamycine du pCGN528.

Le vecteur navette utilisé pour cette construction de pCGN528, est réalisé comme suit : pCGN535 est obtenu par digestion d'un plasmide contenant Tn5, (qui porte un gène de résistance à la Kanamycine) (Jorgensen et al., Mol. Gen. Genet. (1979) 177 : 65), avec HindIII-BamHI et par insertion du fragment HindIII-BamHI contenant le gène de résistance à la Kanamycine dans les sites HindIII-BamHI du gène de résistance à la tétracycline de pACYC184 (Chang et Cohen, J. Bacteriol. (1978) 134 : 1141-1156). pCGN526 est obtenu en insérant le fragment BamHI 19 du pT1A6 (Thomashow et al., Cell (1980) 19 : 729-739) modifié avec des adaptateurs XhoI au niveau du site SmaI, dans le site BamHI du pCGN525. pCGN528 est obtenu en enlevant le petit fragment XhoI suivi d'une nouvelle ligation.

Le plasmide pCGN149a est obtenu en clonant le fragment BamHI du pMB9KanXXI portant le gène de résistance à la Kanamycine dans le site BamHI du pCGN148a. pMB9KanXXI est un vecteur dérivé du plasmide pUC4K (Vieira and Messing, Gene (1982) 19 : 259-268) auquel il manque le site de restriction XhoI mais qui contient le gène de résistance à la Kanamycine de Tn903 permettant une sélection efficace dans *Agrobacterium*. [*4]

pCGN149a est digéré avec HindIII et BamHI et lié avec pUC8 (Vieira and Messing, supra) digéré avec HindIII et BamHI pour produire pCGN169. Ceci élimine le marqueur Kanamycine de

Tn903. pCGN565 et pCGN169 sont tous deux digérés avec HindIII et PstI et reliés pour former pCGN203, un plasmide contenant le promoteur de CaMV 35S et une partie de la région 5' terminale du gène de Kanamycine Tn5 (jusqu'au site PstI) (Jorgensen et al., Mol.Gen. Genet. (1979) 177 : 65). Une région régulatrice 3' est ajoutée au pCGN203 à partir du plasmide pCGN204 (un fragment EcoRI de CaMV (pb 408-6105) contenant la région 3' terminale VI clonée dans pUC18 (Gardner et al., Nucl.Acids Res. (1981) 2 : 2871-2888) par digestion avec HindIII et PstI et ligation. La cassette résultante, pCGN206, est le plasmide de base pour la construction du pCGN986.

Les séquences tml 3' du T-DNA de pTiA6 sont sous-clonées à partir du fragment BamHI19 du T-DNA (Thomashow et al., Cell (1980) 19 : 729-739) sous forme d'un fragment BamHI-EcoRI (nucléotides 9062 à 12823, suivant la numérotation de Barker (Barker et al., Plant Mo. Biol. (1983) 2 : 335-350). Cette séquence est combinée avec l'origine de réplication de pACYC184 (fragment EcoRI-HindII) (Chang and Cohen, J.Bacteriol. (1978) 134 : 1141-1156) et un marqueur de résistance à la gentamycine du plasmide pLB41, (fragment BamHI-HindII) (D. Figurski) pour produire pCGN417.

Le site unique SmaI du pCGN417 (nucléotide 11207 du fragment BamHI19) est changé en un site SacI en utilisant des adaptateurs et le fragment BamHI-SacI est sous-cloné dans pCGN565 pour donner pCGN971. Le site BamHI du pCGN971 est changé en un site EcoRI en utilisant des adaptateurs pour produire pCGN971E. Le fragment EcoRI-SacI du plasmide pCGN971E, contenant la région régulatrice tml 3' est joint au plasmide pCGN206 après digestion par EcoRI et SacI pour donner pCGN975. La petite partie du gène de résistance à la Kanamycine Tn5 est enlevée de la région terminale 3' du promoteur de CaMV 35S par digestion avec SalI et BglII/ en rendant franches les extrémités et en ajoutant des adaptateurs SalI. La cassette finale d'expression pCGN986 contient le promoteur du CaMV 35s suivi de deux sites SalI, d'un site XbaI, BamHI, SmaI, KpnI et de la région tml 3' (nucléotides 11207-9023 du T-DNA).

B) Construction de pCGN164

Le fragment AluI du CaMV (pb 7144-7735) (Gardner et al.,

Nucl. Acids Res. (1981) 9 : 2871-2888) est obtenu par digestion avec AluI et clonage dans le site HincII du M13mp7 (Vieira et Messing, Gene (1982) 19 : 259-268) pour créer C614. Une digestion de C614 par l'enzyme de restriction EcoRI produit le fragment EcoRI contenant le promoteur 35S. Ce fragment est cloné dans le site EcoRI du pUC8 (Vieira and Messing, supra) pour produire pCGN146. Pour diminuer légèrement la région promoteur, le site BglII (pb 7670) est traité avec BglII et Bal31 et par la suite un adaptateur BglII est attaché au DNA traité par Bal31 pour produire pCGN147. pCGN147 est digéré avec EcoRI/HphI et le fragment résultant EcoRI-HphI contenant le promoteur 35S est transféré dans un vecteur M13mp8 digéré par EcoRI et SmaI (Vieira and Messing, supra) pour créer pCGN164.

15 C) Construction de pCGN638

La digestion de CamV10 (Gardner, et al., Nucl. Acids Res. (1981) 9 : 2871-2888) avec BglII produit un fragment BglII contenant une région promoteur 35S (pb 6493-7670) qui est liée dans le site BamHI du pUC19 (Norlander et al., Gene (1983) 26 : 101-106) pour créer pCGN638.

D) Construction de pCGN2113

pCGN164 est digéré avec EcoRV et BamHI pour libérer le fragment EcoRV-BamHI contenant une portion du promoteur 35S (pb 7340-7433). Le plasmide pCGN638 est digéré avec HindIII et EcoRV pour libérer un fragment HindIII-EcoRV contenant une portion différente du promoteur 35S (pb 6493-7340). Ces deux fragments sont liés dans pCGN986 préalablement digéré avec HindIII et BamHI pour enlever le fragment HindIII-BamHI contenant le promoteur 35S ; cette ligation produit pCGN639, qui contient le squelette du plasmide et la région tml-3' du pCGN986 et les deux fragments du promoteur 35S de pCGN164 et pCGN638. pCGN638 est digéré avec EcoRV et DdeI pour libérer un fragment du promoteur 35S (pb 7070-7340). Le fragment est traité avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I pour créer des régions terminales franches et est lié dans le site EcoRV du pCGN639 pour produire pCGN2113 ayant le fragment dans la bonne orientation. Le plasmide pCGN2113 a été déposé à l'ATCC (American Type Culture Collection) le 22 mars 1989,

Numéro d'Accession 40587.

E) Construction de pCGN1761

pCGN2113 est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI et le plasmide est lié en présence d'un adaptateur synthétique 5 contenant un site XbaI et un site BamHI (l'adaptateur contenait les extrémités cohésives EcoRI de chaque côté, mais les bases adjacentes sont telles qu'un site EcoRI n'est pas reconstruit à cet emplacement) pour produire pCGN2113M. pCGN2113M est digéré totalement par SacI et ensuite assujéti à une diges- 10 tion partielle par BamHI. Cet ADN est ensuite traité avec l'ADN polymérase de T4 pour créer des extrémités franches et un adaptateur EcoRI est lié dans le plasmide à extrémités franches. Après transformation un clone portant un plasmide ayant un site EcoRI entre le promoteur et la région intacte 15 tml-3' est choisi et désigné pCGN1761.

F) Construction de pCGN1431

Le fragment SalI-EcoRI de pCGN2113, qui contient la cassette complète promoteur site multiple de restriction - tml 3' est récupéré par digestion SalI-EcoRI et cloné dans le 20 plasmide pCGN565 digéré par SalI-EcoRI pour créer pCGN2120. Le plasmide pCGN565 est un vecteur de clonage basé sur un vecteur pUC8-Cm portant le gène de résistance au chloramphénicol (K.Buckley, Ph.D.Thesis, UC San Diego 1985), mais contenant le multi-site de restriction du pUC18 (Yanisch-Perron et al., 25 Gene (1985) 53 : 103-119). pCGN2120 est digéré totalement avec ti et ensuite lié à nouveau. Un clone ayant éliminé seulement le fragment PstI-PstI de 858 pb (9207-10065, Barker et al., 1983 supra) de la région tml 3' est appelé pCGN1431.

Figure 3 : séquences des peptides dérivées de la protéine SPS.
Tous les peptides sont orientés N->C terminal.

Figure 4 : structure des oligonucléotides utilisés pour les
5 réactions PCR CD3 et CD4 en relation avec les peptides (les
séquences antisens sont présentées en gras). Les flèches
indiquent la direction vers laquelle les oligonucléotides
amorceront la réaction catalysée par la polymérase.

10 Figure 5 A : l'électrophorèse en gel agarose des réactions PCR
CD3 et CD4. Les dimensions sont données en kb.

Figure 5 B : montre une autoradiographie de la tache Southern
des réactions CD3 et CD4 relevées à l'aide de la sonde oligo-
15 nucléotique 4K5.

Figure 6 : carte de restriction de l'ADNc codant pour la SPS.
La partie supérieure représente la carte de restriction du
fragment total d'ADN codant pour la SPS. Les parties infé-
20 rieures représentent la structure des différents clones ayant
permis par combinaison d'aboutir à cette carte de restriction
Les codons de début et de fin de traduction sont indiqués.

Figure 7 : séquence de l'ADNc codant pour la SPS. Les séquen-
25 ces des clones SPS 90, PSP 61 et SPS 3 sont fusionnés aux
points indiqués sur la figure 4. Les trois phases de lecture
ont été traduites. Seule la phase ouverte de lecture cor-
respondant à la SPS est indiquée sous la séquence nucléotique.
Toutes les séquences peptidiques obtenues lors de la purifica-
30 tion et du séquençage de la SPS (peptides de la fig. 3) sont
indiquées dans la séquence.

Figure 8 : caractérisation par la technique Western des séra
anti-SPS 90 et anti-SPS 30 de lapin. pAS** = sérum non immun,
35 SPS 30 de lapin ; AS** = sérum immunisé, SPS 30 ; pAS* = sérum
non immun, SPS 90 de lapin ;
AS* = sérum immunisé anti SPS 90.
Marqueurs de poids moléculaire à gauche,

FEUILLE DE REMPLACEMENT

S = SPS120kd polypeptide ; S* = SPS 90kd polypeptide ; S** = SPS 30kd polypeptide.

Figure 9 A : gel de protéines totales isolées d'une plante de 5 maïs de 30 jours, coloré au Bleu de Coomassie.

M = marqueur de taille ; R = racines ; 1-8 = nombre de feuilles en comptant à partir du pied de la plante. La feuille 5 a été coupée en 5 segments à partir du bout de la feuille (5a) jusqu'à l'extrémité de la gaine (5e). PEP = carboxylase 10 phosphoénolpyruvate.

Figure 9 B : montre les résultats d'une analyse Western utilisant un mélange de séra anti-SPS 30 et anti-SPS 90 dirigé contre les protéines totales isolées d'une plante de maïs de 15 30 jours. Le signal correspondant à la SPS apparaît au niveau 120-140kd.

REVENDICATIONS

- 1) Les protéines ayant l'activité de la saccharose phosphate synthétase (SPS).
- 2) En tant que protéine définie à la revendication 1, la saccharose phosphate synthétase.
- 3) En tant que protéine définie à la revendication 2, la saccharose phosphate synthétase de plante.
- 4) La saccharose phosphate synthétase de maïs.
- 5) Les protéines selon l'une quelconque des revendications précédentes de poids moléculaire de l'ordre de 110 à 130 kD se présentant sous forme de monomère, dimère ou tétramère et leurs dérivés ayant au moins un peptide dont la séquence en acides aminés est la suivante :
ThvTrpIleLys
- 15 TyrValValGluLeuAlaArg
SerMetProProIleTrpAlaGluValMetArg
LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMetHisIleSerHisArg
TrpSerHisAspGlyAlaArg
- 6) Protéines selon la revendication 5 ayant la séquence en acides aminés décrite figure 7.
- 7) Dérivés des protéines selon les revendications 1 à 6, modifiés par les techniques du génie génétique et présentant l'activité de la SPS.
- 8) Procédé de préparation de protéines selon l'un quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que :
 - a) on fait un extrait à partir de parties des plantes concernées à basse température par broyage, centrifugation et filtration.
 - b) on enrichit en protéine SPS l'extrait obtenu par précipitation dans un solvant approprié, centrifugation et solubilisation du précipité obtenu dans une solution tampon.
 - c) on purifie la protéine active ainsi obtenue par chromatographie et si désiré,
 - d) on prépare des hybridomes et des anticorps monoclonaux à partir d'une solution antigénique obtenue à partir d'une des préparations obtenues aux paragraphes a), b), et c) ci-dessus.
 - e) crible les hybridomes et sélectionne le ou les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la SPS.

- g) purifie la SPS obtenue au moyen des anticorps ainsi préparés.
- 9) Procédé de préparation de la SPS de maïs selon la revendication 8, caractérisé en ce que :
- 5 a) on fait un extrait à partir de parties de plantes de maïs conservées à basse température par broyage, centrifugation et filtration.
- b) on enrichit en protéine l'extrait obtenu par précipitation dans le polyéthylèneglycol, centrifugation et solubilisation
- 10 du précipité obtenu dans une solution tampon.
- c) on purifie la protéine SPS ainsi obtenu par chromatographie d'échange d'anion basse pression, puis par chromatographie sur héparine Sépharose, puis par chromatographie d'échange d'anion haute pression.
- 15 d) on purifie les fractions actives par passage sur 2 colonnes de chromatographie haute pression, et, si désiré,
- e) on prépare des hybridomes et des anticorps monoclonaux à partir d'une solution antigénique obtenue à partir d'une préparation a), b), c).
- 20 f) crible les hybridomes et sélectionne les anticorps dirigés spécifiquement contre la SPS.
- g) purifie la SPS obtenue précédemment au moyen des anticorps ainsi préparés.
- 10) Lignées cellulaires d'hybridomes obtenus selon la revendication 8 ou 9.
- 25 cation 8 ou 9.
- 11) Lignées cellulaires d'hybridomes selon la revendication 10, désignés par :
- | | |
|--------------|-----------|
| SPA2-2-3 | SPB3-2-19 |
| SPA2-2-22 | SPB5-2-10 |
| 30 SPA2-2-25 | SPB5-4-2 |
| | SPB13-1-7 |
| | SPB13-2-2 |
- 12) Anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les protéines définies selon l'une quelconque des revendications 1
- 35 à 7.
- 13) Anticorps selon la revendication 12 dirigés spécifiquement contre la SPS de maïs.
- 14) Procédé de préparation des protéines selon l'une quel-

conque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on fait passer une préparation contenant les dites protéines sur une colonne de chromatographie renfermant des anticorps monoclonaux selon les revendications 12 ou 13 dirigés spécifiquement contre les dites protéines et obtient ainsi les protéines recherchées.

15) Les ADNC codant pour protéines des revendications 1 à 7.

16) L'ADNC selon la revendication 15 codant pour la SPS de maïs.

10 17) L'ADNC selon la revendication 16 ayant la séquence en nucléotides, décrite figure 7.

18) L'ADN génomique comprenant la partie codant pour les protéines définies précédemment et les séquences nécessaires à l'expression et la régulation de cette protéine dans les

15 plantes.

19) Procédé pour modifier le taux d'expression de la SPS dans une plante, caractérisé en ce que l'on transforme les cellules de la dite plante au moyen d'un vecteur d'expression renfermant l'ADNC défini aux revendications 16 et 17.

20 20) Vecteur permettant l'expression de la protéine SPS sous le contrôle d'un promoteur capable de diriger l'expression et de préférence la surexpression de la dite SPS dans une cellule de plante et d'une région 3' comportant les signaux de régulation de transcription pour l'expression du gène codant pour la SPS.

25 21) Plantes obtenues selon le procédé 19 ayant un schéma de partage du carbone modifié.

22) Semences des plantes de la revendication 21.

M H PF EF D M

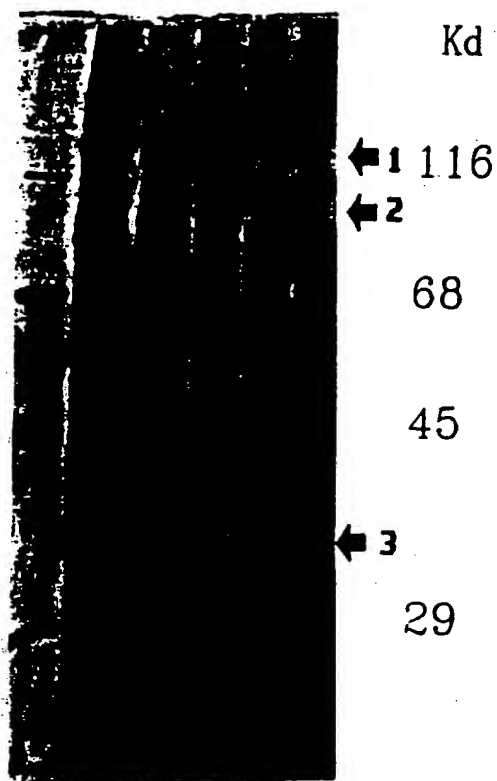


FIGURE 1

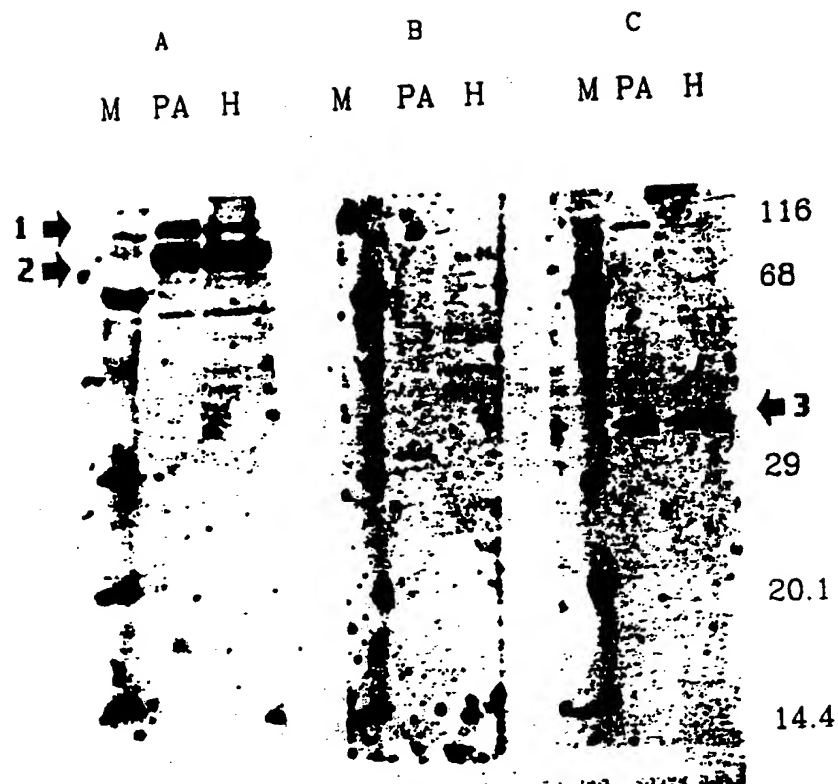


FIGURE 2

3/12

SPS 90 kd PEPTIDES

A8 ThrTrpIleLys
B4 TyrValValGluLeuAlaArg
B11 SerMetProProIleTrpAlaGluValMetArg

SPS 30 kd PEPTIDES

4K LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMetHisIleSerHisArg
12N TrpSerHisAspGlyAlaArg

FIGURE 3

4/12

4K
 LeuArgProAspGlnAspTyrLeuMethHisIleSerHisArg
 TTAAGACCAAGCAAGACTACTTAATGCACATAAAGACACAGA
 C GC C C T G T TC C T CTCC TC C
 C G G G T T G T
 T T T T
 4K3
 <---- CTAGTCCTAATAGATTACGT
 G T G G C
 4K1S
 GACCAAGACTACCTTATGCA ----->
 T G T T C
 4K2
 TAGGTATATCAGTAGC
 G G G GT
 4K5
 AATGGGIGICTAGT
 G CT C C G
 B11
 SerMetProProlleTrrpAlaGluValMetArg
 TCAATGCCACCAATATGGGCAGAGTAATGCGA
 AGC C C C C G C A C
 G G G T G G T
 T T T T
 CD1 B11C ATGCCICCIATATGGGCGA ---->
 C C C C T
 CD4 B11B <--- TAGGGIGGTTAAACCCGICT
 C C G C
 B11A
 ACCCGICTCCCAITACGC
 C T C T
 B11A
 TAGGTATATCAGTAGC
 G G G GT

FIGURE 4

5/12

CD3 CD4 M



1.4
1.1

A

CD3 CD4 M



FIGURE 5

WO 92/01782

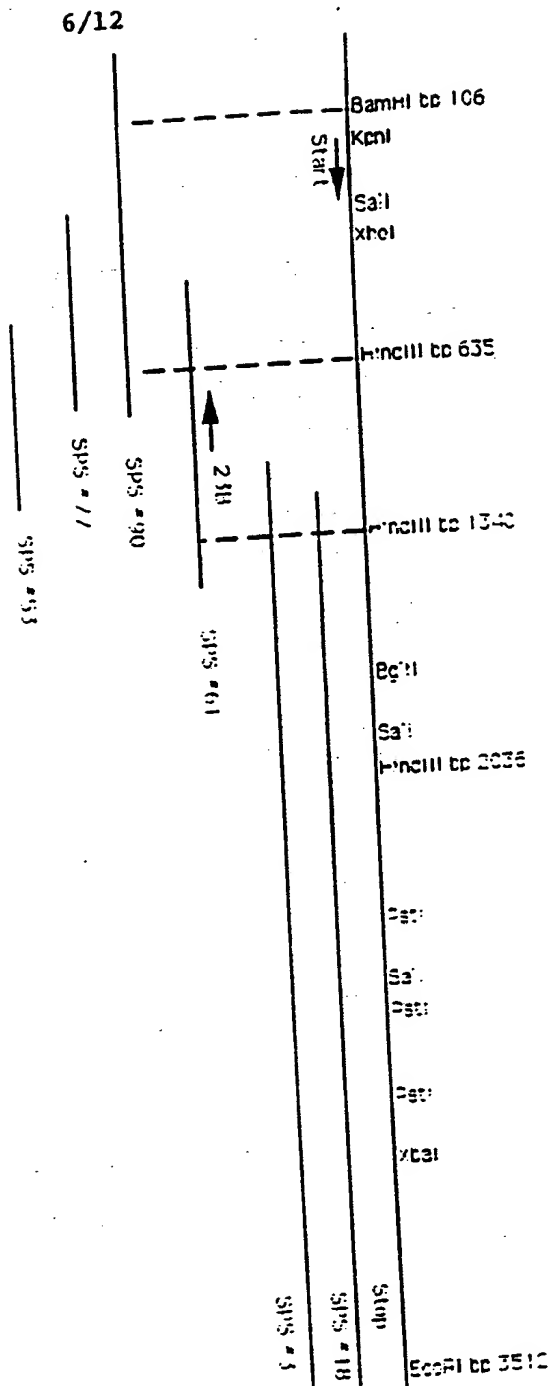


FIGURE 6

7/12

SPS cDNA sequence

EcoRI
 1 GAATTCCGGCGTGGGCGCTGGGCTAGTGCTCCGCGAGCGAGCGATCTGAGAGAACGGTAGAGTTCCGGC 69
 2

BamHI
 70 CGGGCGCGCGGAGAGGAGGAGGGTCGGGCGGGGAGGATCCGATGGCCGGGAACGAGTGGATCAATGGG 138
 METAlaGlyAsnGluTrpIleAsnGly
 106

KpnI
 139 TACCTGGAGGCGATCCTCGACAGCCACACCTCGTCGCGGGGTGCCGGCGGGCGGCGGGCGGGGGGAC 207
 TyrLeuGluAlaIleLeuAspSerHisThrSerSerArgGlyAlaGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyAsp
 142

208 CCCAGGTCGCCGACGAAGGCGGCGAGCCCCGCGGCGCGCACATGAACTTCAACCCCTCGCACTACTTC 276
 ProArgSerProThrLysAlaAlaSerProArgGlyAlaHisMETAsnPheAsnProSerHisTyrPhe

SalI
 277 GTCGAGGAGGTGGTCAAGGGCGTCGACGAGAGCGACCTCCACCGGACGTGGATCAAGGTCGTCGCCACC 345
 ValGluGluValValLysGlyValAspGluSerAspLeuHisArgThrTrpIleLysValValAlaThr
 299 A8

XhoI
 346 CGCAACGCCCGCGAGCGCAGCACCCAGGCTCGAGAACATGTGCTGGCGGATCTGGCACCTCGCGCGCAAG 414
 ArgAsnAlaArgGluArgSerThrArgLeuGluAsnMETCysTrpArgIleTrpHisLeuAlaArgLys
 374

415 AAGAAGCAGCTGGAGCTGGAGGGCATCCAGAGAATCTCGGCAAGAAGGAAGGAACAGGAGCAGGTGCGT 483
 LysLysGlnLeuGluLeuGluGlyIleGlnArgIleSerAlaArgArgLysGluGlnGluGlnValArg

484 CGTGAGGCGACGGAGGACCTGGCCGAGGATCTGTCAGAAGGCGAGAAGGGAGACACCATCGGCGAGCTT 552
 ArgGluAlaThrGluAspLeuAlaGluAspLeuSerGluGlyGluLysGlyAspThrIleGlyGluLeu

553 GCGCCGGTTGAGACGACCAAGAAGAAGTTCCAGAGGAATTCTCTGACCTTACCGTCTGGTCTGACGAC 621
 AlaProValGluThrThrLysLysLysPheGlnArgAsnPheSerAspLeuThrValTrpSerAspAsp

HindIII
 622 AATAAGGAGAAGAAGCTTTACATTGTGCTCATCAGCGTGCATGGTCTTGTTCTGGAGAAAACATGGAA 690
 AsnLysGluLysLysLeuTyrIleValLeuIleSerValHisGlyLeuValArgGlyGluAsnMETGlu
 635

691 CTAGGTCGTGATTCTGATACAGGTGGCCAGGTGAAATATGTGGTCTGAACTTGCAAGAGCGATGTCAATG 759
 LeuGlyArgAspSerAspThrGlyGlyGlnValLysTyrValValGluLeuAlaArgAlaMETSerMET
 B4

760 ATGCCTGGAGTGACAGGGTGGACCTCTTCACTCGTCAAGTGTCATCTCCTGACGTGGACTGGAGCTAC 828
 METProGlyValTyrArgValAspLeuPheThrArgGlnValSerSerProAspValAspTrpSerTyr

FIGURE 7 1/4

BLANK PAGE

8/12

829 GGTGAGCCAACCGAGATGTTATGCGCCGGTTCCAATGATGGAGAGGGGATGGGTGAGAGTGGCGGAGCC 897
GlyGluProThrGluMETLeuCysAlaGlySerAsnAspGlyGluGlyMETGlyGluSerGlyGlyAla

898 TACATTGTGCGCATACCGTGTGGGCCGCGGGATAAATACCTCAAGAAGGAAGCGTTGTGGCCTTACCTC 966
TyrIleValArgIleProCysGlyProArgAspLysTyrLeuLysLysGluAlaLeuTrpProTyrLeu

967 CAAGAGTTTGTGCGATGGAGCCCTTGCGCATATCCTGAACATGTCCAAGGCTCTGGGAGAGCAGGTTGGA 1035
GlnGluPheValAspGlyAlaLeuAlaHisIleLeuAsnMETSerLysAlaLeuGlyGluGlnValGly

1036 AATGGGAGGCCAGTACTGCCTTACGTGATACATGGGCACTATGCCGATGCTGGAGATGTTGCTGCTCTC 1104
AsnGlyArgProValLeuProTyrValIleHisGlyHisTyrAlaAspAlaGlyAspValAlaAlaLeu

1105 CTTTCTGGTGCCTGAATGTGCCAATGGTGCTCACTGGCCACTCACTTGGGAGGAACAAGCTGGAACAA 1173
LeuSerGlyAlaLeuAsnValProMETValLeuThrGlyHisSerLeuGlyArgAsnLysLeuGluGln

1174 CTGCTGAAGCAAGGGCGCATGTCCAAGGAGGAGATCGATTGACATACAAGATCATGAGGCGTATCGAG 1242
LeuLeuLysGlnGlyArgMETSerLysGluGluIleAspSerThrTyrLysIleMETArgArgIleGlu

1243 GGTGAGGAGCTGGCCCTGGATGCGTCAGAGCTTGTAAATCACGAGCACAAGGCAGGAGATTGATGAGCAG 1311
GlyGluGluLeuAlaLeuAspAlaSerGluLeuValIleThrSerThrArgGlnGluIleAspGluGln

HindIII
|

1312 TGGGGATTGTACGATGGATTTGATGTCAAGCTTGAGAAAGTGCTGAGGGCACGGGCGAGGCGGGGGTT 1380
TrpGlyLeuTyrAspGlyPheAspValLysLeuGluLysValLeuArgAlaArgAlaArgArgGlyVal
1340

NcoI
|

1381 AGCTGCCATGGTCGTTACATGCCTAGGATGGTGGTGATTCTCCGGGAATGGATTTTCAGCAATGTTGTA 1449
SerCysHisGlyArgTyrMETProArgMETValValIleProProGlyMETAspPheSerAsnValVal
1387

1450 GTTCATGAAGACATTGATGGGGATGGTGACGTCAAAGATGATATCGTTGGTTTGGAGGGTGCCTCACCC 1518
ValHisGluAspIleAspGlyAspGlyAspValLysAspAspIleValGlyLeuGluGlyAlaSerPro

1519 AAGTCAATGCCCCAATTTGGGCCGAAGTGATGCGGTTCTGACCAACCCTCACAAGCCGATGATCCTG 1587
LysSerMETProProIleTrpAlaGluValMETArgPheLeuThrAsnProHisLysProMETIleLeu
B11

1588 GCGTTATCAAGACCAGACCCGAAGAAGAACATCACTACCCTCGTCAAAGCGTTTGGAGAGTGTCTGTTCA 1656
AlaLeuSerArgProAspProLysLysAsnIleThrThrLeuValLysAlaPheGlyGluCysArgPro

1657 CTCAGGGAACCTTGCAAACCTTACTCTGATCATGGGTAACAGAGATGACATCGACGACATGTCTGCTGGC 1725
LeuArgGluLeuAlaAsnLeuThrLeuIleMETGlyAsnArgAspAspIleAspAspMETSerAlaGly

1726 AATGCCAGTGTCTCACCACAGTTCTGAAGCTGATTGACAAGTATGATCTGTACGGAAGCGTGGCGTTC 1794
AsnAlaSerValLeuThrThrValLeuLysLeuIleAspLysTyrAspLeuTyrGlySerValAlaPhe

BglII
|

1795 CCTAAGCATCACAATCAGGCTGACGTCCCGGAGATCTATCGCCTCGCGGCCAAAATGAAGGGCGTCTTC 1863
ProLysHisHisAsnGlnAlaAspValProGluIleTyrArgLeuAlaAlaLysMETLysGlyValPhe
1827

1864 ATCAACCCTGCTCTCGTTGAGCCGTTTGGTCTCACCTGATCGAGGCTGCGGCACACGGACTCCCGATA 1932
IleAsnProAlaLeuValGluProPheGlyLeuThrLeuIleGluAlaAlaAlaHisGlyLeuProIle

BLANK PAGE

9/12

SalI

1933 GTCGCTACCAAGAATGGTGGTCCGGTCGACATTACAAATGCATTAAACAACGGACTGCTCGTTGACCCA 2001
ValAlaThrLysAsnGlyGlyProValAspIleThrAsnAlaLeuAsnAsnGlyLeuLeuValAspPro
1958

HindIII

2002 CACGACCAGAACGCCATCGCTGATGCACTGCTGAAGCTTGTGGCAGACAAGAACCCTGTGGCAGGAATGC 2070
HisAspGlnAsnAlaIleAlaAspAlaLeuLeuLysLeuValAlaAspLysAsnLeuTrpGlnGluCys
2036

2071 CGGAGAAACGGGCTGCGCAACATCCACCTCTACTCATGGCCGGAGCACTGCCGCACTTACCTCACCAGG 2139
ArgArgAsnGlyLeuArgAsnIleHisLeuTyrSerTrpProGluHisCysArgThrTyrLeuThrArg

2140 GTGGCCGGGTGCCGGTTAAGGAACCCGAGGTGGCTGAAGGACACACCAGCAGATGCCGGAGCCGATGAG 2208
ValAlaGlyCysArgLeuArgAsnProArgTrpLeuLysAspThrProAlaAspAlaGlyAlaAspGlu

NcoI

2209 GAGGAGTTCCTGGAGGATTCCATGGACGCTCAGGACCTGTCACTCCGTCTGTCCATCGACGGTGAGAAG 2277
GluGluPheLeuGluAspSerMETAspAlaGlnAspLeuSerLeuArgLeuSerIleAspGlyGluLys
2229

2278 AGCTCGCTGAACACTAACGATCCACTGTGGTTCGACCCCCAGGATCAAGTGCAGAAGATCATGAACAAC 2346
SerSerLeuAsnThrAsnAspProLeuTrpPheAspProGlnAspGlnValGlnLysIleMETAsnAsn

2347 ATCAAGCAGTCGTCAGCGCTTCCTCCGTCCATGTCTCAGTCGCAGCCGAGGGCACAGGCAGCACCATG 2415
IleLysGlnSerSerAlaLeuProProSerMETSerSerValAlaAlaGluGlyThrGlySerThrMET

2416 AACAAATACCACTCCTGCGCCGGCGCCGGCGCTTGTTCTGCATAGCTGTGGACTGCTACCAGGACGAT 2484
AsnLysTyrProLeuLeuArgArgArgArgLeuPheValIleAlaValAspCysTyrGlnAspAsp

PstI

2485 GGCCGTGCTAGCAAGAAGATGCTGCAGGTGATCCAGGAAGTTTTTCAGAGCAGTCCGATCGGACTCCCAG 2553
GlyArgAlaSerLysLysMETLeuGlnValIleGlnGluValPheArgAlaValArgSerAspSerGln
2511

BglII SalI PstI

2554 ATGTTCAAGATCTCAGGGTTCACGCTGTCGACTGCCATGCCGTTGTCCGAGACACTCCAGCTTCTGCAG 2622
METPheLysIleSerGlyPheThrLeuSerThrAlaMETProLeuSerGluThrLeuGlnLeuLeuGln
2562 2581 2622

2623 CTCGGCAAGATCCCAGCGACCGACTTCGACGCCCTCATCTGTGGCAGCGGCAGCGAGGTGTACTATCCT 2691
LeuGlyLysIleProAlaThrAspPheAspAlaLeuIleCysGlySerGlySerGluValTyrTyrPro

2692 GGCACGGCGAACTGCATGGACGCTGAAGGAAAGCTGCGCCAGATCAGGACTATCTGATGCACATCAGC 2760
GlyThrAlaAsnCysMETAspAlaGluGlyLysLeuArgProAspGlnAspTyrLeuMETHisIleSer
4K

2761 CACCGCTGGTCCCATGACGGCGGAGGCAGACCATAGCGAAGCTCATGGGCGCTCAGGACGGTTCAGGC 2829
HisArgTrpSerHisAspGlyAlaArgGlnThrIleAlaLysLeuMETGlyAlaGlnAspGlySerGly
=====

12N

BLANK PAGE

10/12

2830 GACGCTGTCGAGCAGGACGTGGCGTCCAGTAATGCACACTGTGTCGCGTTCCTCATCAAAGACCCCCAA 2898
AspAlaValGluGlnAspValAlaSerSerAsnAlaHisCysValAlaPheLeuIleLysAspProGln

2899 AAGGTGAAAACGGTCGATGAGATGAGGGAGCGGCTGAGGATGCGTGGTCTCCGCTGCCACATCATGTAC 2967
LysValLysThrValAspGluMETArgGluArgLeuArgMETArgGlyLeuArgCysHisIleMETTyr

PstI

2968 TGCAGGAACTCGACAAGGCTTCAGGTTGTCCCTCTGCTAGCATCAAGGTCACAGGCACTCAGGTATCTT 3036
CysArgAsnSerThrArgLeuGlnValValProLeuLeuAlaSerArgSerGlnAlaLeuArgTyrLeu
2972

XbaI

3037 TCCGTGCGCTGGGGCGTATCTGTGGGGAACATGTATCTGATCACCGGGGAACATGGCGACACCGATCTA 3105
SerValArgTrpGlyValSerValGlyAsnMETTyrLeuIleThrGlyGluHisGlyAspThrAspLeu
3103

3106 GAGGAGATGCTATCCGGGCTACACAAGACCGTGATCGTCCGTGGCGTCACCGAGAAGGGTTCGGAAGCA 3174
GluGluMETLeuSerGlyLeuHisLysThrValIleValArgGlyValThrGluLysGlySerGluAla

3175 CTGGTGAGGAGCCCAGGAAGCTACAAGAGGGACGATGTCGTCCCGTCTGAGACCCCCTTGGCTGCGTAC 3243
LeuValArgSerProGlySerTyrLysArgAspAspValValProSerGluThrProLeuAlaAlaTyr

3244 ACGACTGGTGAGCTGAAGGCCGACGAGATCATGCGGGCTCTGAAGCAAGTCTCCAAGACTTCCAGCGGC 3312
ThrThrGlyGluLeuLysAlaAspGluIleMETArgAlaLeuLysGlnValSerLysThrSerSerGly

3313 ATGTGAATTTGATGCTTCTTTTACATTTTGTCTTTTCTTCACTGCTATATAAAATAAGTTGTGAACAG 3381
MET .

3382 TACCGCGGGTGTGTATATATATATTGCAGTGACAAATAAACAGGACACTGCTAACTATACTGGTGAAT 3450

EcoRI

3451 ATACGACTGTCAAGATTGTATGCTAAGTACTCCATTTCTCAATGTATCAATCGGAATTC 3509
3505

BLANK PAGE

11/12

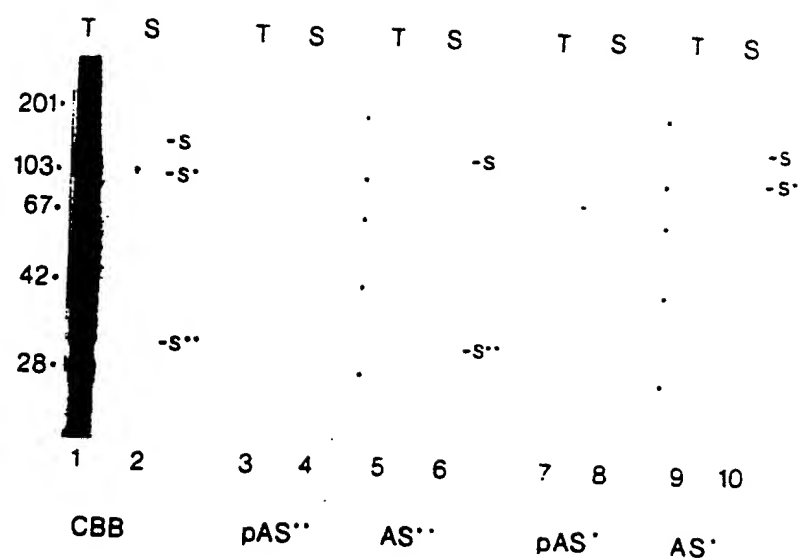


FIGURE 8

BLANK PAGE

12/12

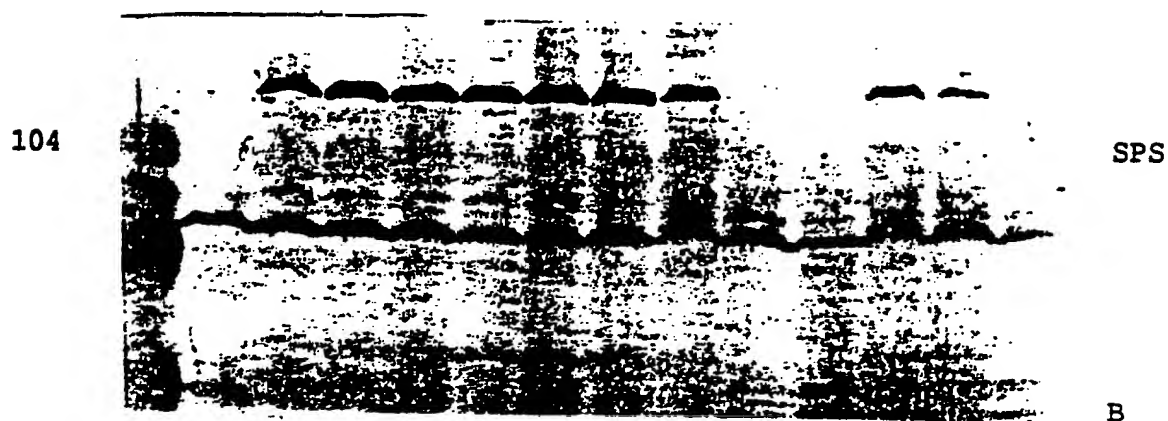
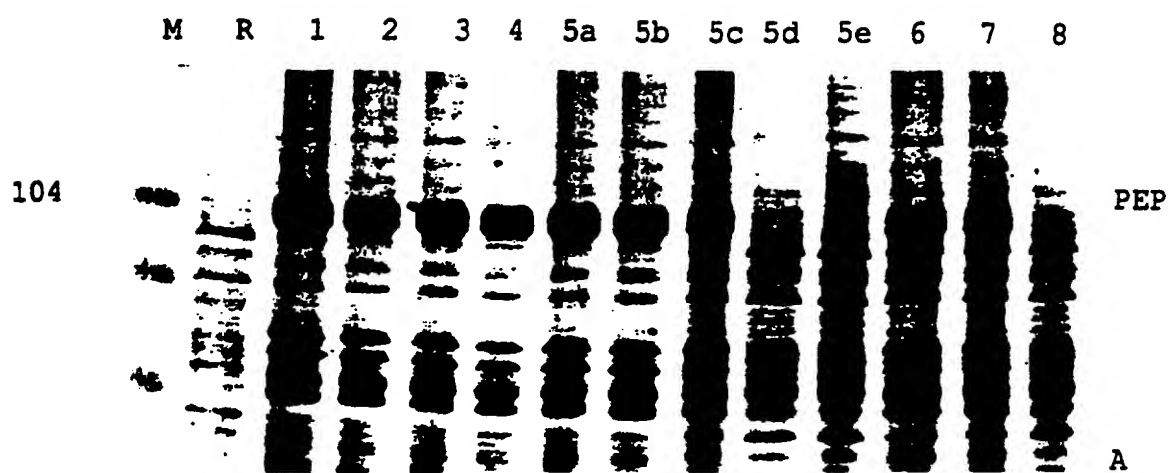


FIGURE 9

PAGE

BLANK PAGE

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

BLANK PAGE